

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION
(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 03 July 2001 (03.07.01)

International application No. PCT/EP00/08121	Applicant's or agent's file reference 51739AWOM1XX
---	---

International filing date (day/month/year) 19 August 2000 (19.08.00)	Priority date (day/month/year) 24 September 1999 (24.09.99)
---	--

Applicant SCHIRNER, Michael et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

16 February 2001 (16.02.01)

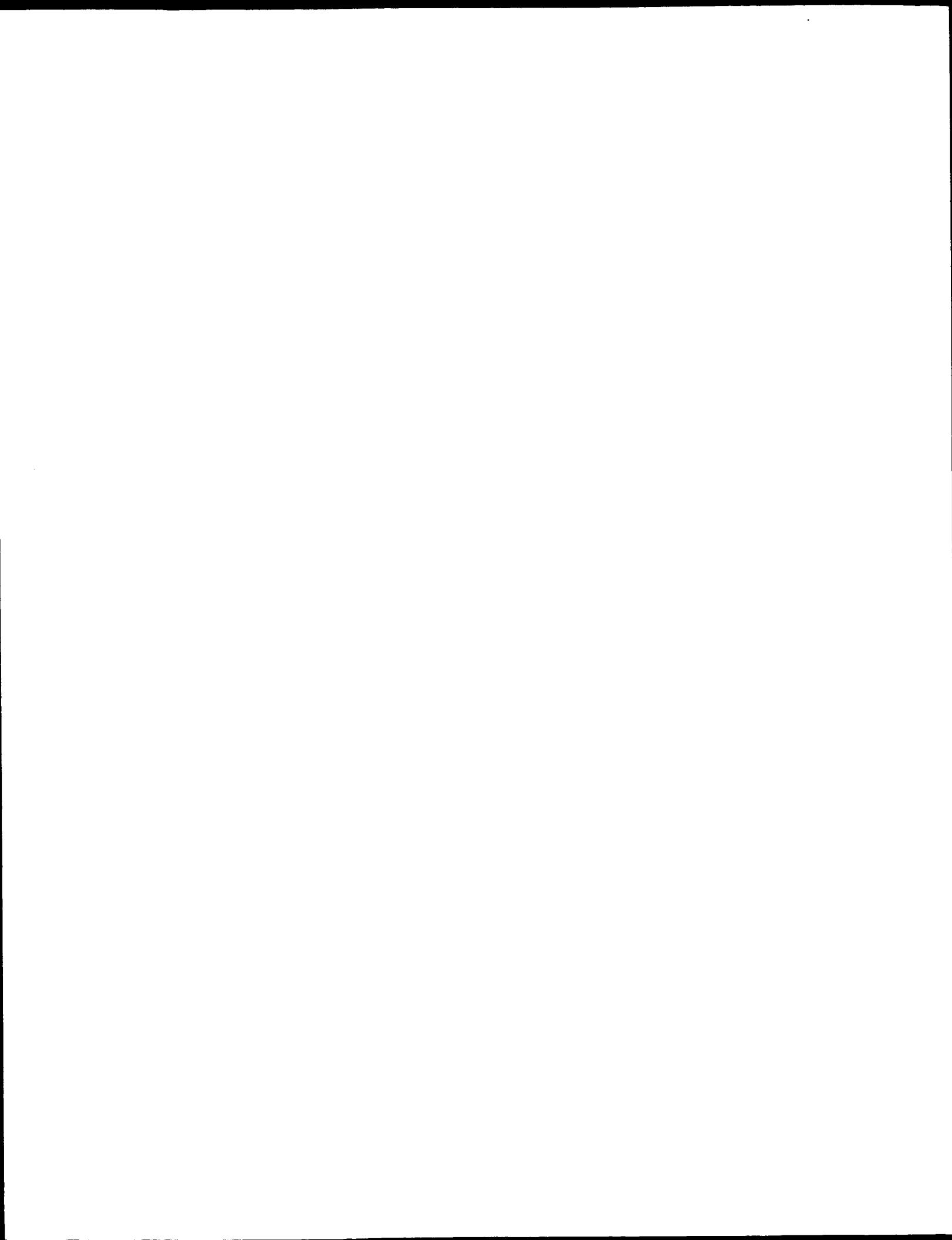
in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Nestor Santesso Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
5. April 2001 (05.04.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/23005 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 49/00 // C07K 16/18**

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP00/08121**

(22) Internationales Anmeldedatum:
19. August 2000 (19.08.2000)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:
199 47 559.8 24. September 1999 (24.09.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstr. 178, 13342 Berlin (DE).**

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **SCHIRNER, Michael [DE/DE]; Birkenallee 12, D-13158 Berlin (DE). LICHA, Kai [DE/DE]; Bornimer Str. 17A, D-14612 Falkensee (DE). DINKELBORG, Ludger [DE/DE]; Ortwinstr. 7, D-13465 Berlin (DE).**

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Mit internationalem Recherchenbericht.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 01/23005 A1

(54) Title: ANTIBODY DYE CONJUGATES FOR BINDING TO TARGET STRUCTURES OF ANGIOGENESIS IN ORDER TO INTRAOPERATIVELY DEPICT TUMOR PERIPHERIES

(54) Bezeichnung: ANTIKÖRPER-FARBSTOFFKONJUGATE GEGEN ZIELSTRUKTUREN DER ANGIOGENESE ZUR INTRAOPERATIVEN TUMORRANDDARSTELLUNG

(57) Abstract: The invention relates to antibody dye conjugates which are suited for binding to structures of newly formed vessels and to their use for interoperatively depicting pathological angiogenesis.

(57) Zusammenfassung: Es werden Antikörper-Farbstoffkonjugate, die geeignet sind an Strukturen neugebildeter Gefäße zu binden und deren Verwendung zur intraoperativen Darstellung der pathologischen Angiogenese beschrieben.



Antikörper-Farbstoffkonjugate gegen Zielstrukturen der Angiogenese zur intraoperativen Tumorranddarstellung

5 Die vorliegende Erfindung betrifft Antikörper-Farbstoffkonjugate, die geeignet sind an Strukturen neugebildeter Gefäße zu binden und deren Verwendung zur intraoperativen Darstellung der pathologischen Angiogenese.

Im erwachsenen Organismus findet bis auf wenige Ausnahmen (z. B. der Zyklus 10 der gebärfähigen Frau) keine Neubildung von Gefäßen statt. Die Neubildung von Gefäßen ist jedoch bei vielen Erkrankungen zu beobachten. Der hier stattfindende Prozeß der Gefäßneubildung wird als Angiogenese bezeichnet und findet als Antwort auf bestimmte Signale statt.

15 Die Angiogenese ist ein Prozeß, der im Randbereich eines Krankheitsherdes bevorzugt stattfindet. Aus dem Zentrum des Krankheitsherdes werden Faktoren freigesetzt, die zum Randbereich des Krankheitsherdes diffundieren. Diese Faktoren werden auch als Angiogenesestimulatoren bezeichnet. Erreichen diese Angiogenesestimulatoren das gesunde Gewebe im Randbereich eines 20 Krankheitsherdes, werden bisher nicht in den Krankheitsherd einbezogene Gefäße stimuliert, neue Gefäßknospen zu bilden. Die von diesen Gefäßknospen auswachsenden Gefäße bilden ein neues Kapillargefäßnetz im Randbereich des Krankheitsherdes. Durch diesen Prozeß kann immer eine adäquate Nährstoffversorgung für den Krankheitsherd sichergestellt werden. Als 25 besonders wichtig hat sich herausgestellt, daß das Wachstum von Tumoren und deren Metastasen von der Fähigkeit abhängt, die Angiogenese zu induzieren.

Die chirurgische Therapie ist heute eine Standardmaßnahme zur Behandlung von lokalisierten Krankheitsherden. Große Bedeutung hat sie bei der 30 Tumorbehandlung erlangt. Es hat sich aber herausgestellt, daß trotz verbesserter chirurgischer Techniken die Zahl der lokalen Rezidive beträchtlich ist, da die anatomischen Gegebenheiten im menschlichen Organismus nur selten eine großräumige Entfernung der Krankheitsherde zulassen. In vielen

Organen (z. B. im Gehirn) muß auf ein großräumiges Entfernen verzichtet werden, um gesundes Gewebe zu erhalten. Das Risiko der Verletzung gesunder Organe steigt mit der Radikalität des chirurgischen Eingriffs.

- 5 Histologische Untersuchungen des Tumorrandsbereiches nach erfolgter chirurgischer Tumorentfernung haben jedoch gezeigt, daß eine Vielzahl von Tumoren nicht vollständig entfernt werden können und Tumorreste im Körper verbleiben. Von diesen Tumorresten kann weiteres Tumorwachstum und auch die Tumormetastasierung ausgehen. Ein Verfahren, daß die Grenzen eines
- 10 Krankheitsprozesses zum gesunden Gewebe während der chirurgischen Behandlung exakt darstellt, würde es erlauben, Krankheitsherde vollständig zu entfernen und das gesunde Gewebe weitgehend zu schonen.

Farbstoffe zur Darstellung von Krankheitsherden sind bereits bekannt (Poon WS et al., J Neurosurgery (1992) 76: 679-686, Haglund MM et al., Neurosurgery (1996) 38: 308-317). Sie werden vorzugsweise von Tumorzellen direkt aufgenommen oder reichern sich unspezifisch im extrazellulären Raum der Tumoren an. Da der Mechanismus der Anreicherung auch im gesunden Gewebe nachweisbar ist, ist die Spezifität und Empfindlichkeit der verwendeten

20 Substanzen gering.

Verbindungen, die für die intraoperative Abgrenzung der Krankheitsherde durch selektive Darstellung des Randbereiches eines Krankheitsherdes verwendet werden können, sind bisher nicht bekannt.

25 Die Angiogenese findet im Randbereich von Krankheitsherden bevorzugt statt. Durch Darstellung der Angiogenese kann die Grenze zum gesunden Gewebe dargestellt werden. Antikörper zum Nachweis der Angiogenese im Krankheitsherd sind bereits bekannt und werden zur Darstellung von

30 neugebildeten Gefäßen im histologischen Gewebeschnitt, zum Nachweis verschiedener Proteine im Krankheitsherd oder als Trägermoleküle für therapeutische Substanzen verwendet.

-3-

Nicht bekannt sind jedoch Antikörper in Kombination mit Farbstoffen, sogenannte Antikörper-Farbstoffkonjugate, die für die intraoperative Abgrenzung der Krankheitsherde durch selektive Darstellung des Randbereichs eines Krankheitsherdes zum Einsatz kommen können.

5 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, Antikörper-Farbstoffkonjugate für die intraoperative Tumorranddarstellung bereitzustellen. Die Antikörper der erfindungsgemäßen Antikörper-Farbstoffkonjugate sind gegen Strukturen gerichtet, die spezifisch für den Prozeß der Angiogenese sind. Die erfindungsgemäßen Antikörper-Farbstoffkonjugate umfassen Farbstoffe, die 10 durch ihre Anreicherung eine optisch Darstellung ermöglichen.

Da die Angiogenese im Randbereich eines Krankheitsherdes am stärksten ausgebildet ist, kommt es hier zum größten optischen Signal.

Die erfindungsgemäßen Antikörper-Farbstoffkonjugate sind somit geeignet, die Grenze eines Krankheitsherdes, den sogenannten Randbereich, zum gesunden

15 Gewebe durch intraoperative, optische Diagnostik darzustellen. Hierdurch wird es ermöglicht, den Krankheitsherd bei weitgehender Schonung des gesunden Gewebes vollständig zu entfernen.

Es sind Antikörper bekannt, die gegen Moleküle gerichtet sind, die im 20 angiogenetisch aktiven Gewebe stark exprimiert und im angrenzenden Gewebe nur auf sehr geringem Niveau exprimiert sind (WO 96/01653).

Von besonderem Interesse in den Antikörper-Farbstoffkonjugaten sind 25 Antikörper, die gegen die Rezeptoren für vaskuläre Wachstumsfaktoren gerichtet sind, Rezeptoren auf Endothelzellen, an die Entzündungsmediatoren binden, Rezeptoren auf Endothelzellen, an die Matrixmoleküle binden und Matrixproteine, die spezifisch bei der Gefäßneubildung exprimiert werden (Brekken et al., Cancer Res. (1998) 58: 1952-9 und Schold SC Jr et al., Invest. Radiol. (1993) 28: 488-96).

30 Bevorzugt sind Antikörper oder Antikörperfragmente, die gegen das Matrixprotein EDB-Fibronectin gerichtet sind. EDB-Fibronectin (EDBFN), auch als onkofetales Fibronectin bekannt, ist eine Splicevariante des Fibronektins,

-4-

das sich spezifisch um neugebildete Gefäße im Prozeß der Angiogenese bildet. Der besondere Vorteil von Antikörpern gegen das EDB-Fibronectin besteht darin, daß es durch intraoperative Verwundung bei der Entfernung des Krankheitsherdes zu keiner Neubildung des EDB-Fibronektins im gesunden Gewebe kommt. Hierdurch bleibt die Spezifität während des chirurgischen Eingriffs erhalten. Antikörper gegen Wachstumsfaktorrezeptoren oder Entzündungsmediatoren auf der Endothelzelle, die ebenfalls spezifisch im Tumorrandsbereich exprimiert werden, können aber während des chirurgischen Eingriffs auch im gesunden Gewebe in der Nähe des Krankheitsherdes neugebildet werden.

10

Besonders bevorzugt im erfinderischen Antikörper-Farbstoffkonjugat sind die Antikörper L19 und E8 gegen das EDB-Fibronectin (Viti F et al, Cancer Res (1999) 59: 347-352).

15 Solche Antikörper-Farbstoffkonjugate sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Die bekannten Antikörper werden mit Farbstoffen konjugiert, deren Anreicherung im Gewebe optisch detektiert werden kann und die intraoperativen 20 Abgrenzung des Randbezirkes eines Krankheitsherdes ermöglicht.

Der Vorteil der erfindungsgemäßen Antikörper-Farbstoffkonjugate besteht nun darin, daß diese für eine selektive Fluoreszenzanfärbung von Geweben in neoangiogenetischem Stadium zur Anwendung kommen können. Die 25 Fluoreszenzanfärbung ist tumorspezifisch und liefert ein Fluoreszenzsignal, daß in hohem Signal-zu-Untergrund-Verhältnis detektiert werden kann.

Es sind auch Antikörper-Farbstoffkonjugate für die Fluoreszenzbildgebung zum Zwecke der perkutanen, nicht-invasiven Tumordarstellung bekannt (Neri D et al., 30 Nature Biotechnology (1997) 15: 1271-1275).

Nicht bekannt jedoch sind Antikörper-Farbstoffkonjugate, die sich im Randbereich eines Krankheitsherdes bevorzugt anreichern.

Es sind auch Protein-Farbstoffkonjugate zur intraoperativen Tumordarstellung bekannt.

Nachteilig an diesen Konjugaten ist, daß insbesondere hypoxische als auch 5 metabolisch unversorgte Tumorzellen die Konjugate aufnehmen. Da das Gewebe im Randbereich von Tumoren aber gut vaskularisiert ist und hierdurch die Zellen ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt sind, gelingt gerade hierdurch keine ausreichende Anreicherung der bekannten Protein-Farbstoffkonjugate.

10

Dagegen sind die erfindungsgemäßen Antikörper-Farbstoffkonjugate von dem metabolischen Zustand des Krankheitsherdes weitgehend unabhängig.

Obwohl die optische Erfassung der Grenzen eines Krankheitsherdes auf 15 unterschiedliche Weise erfolgen kann, wird generell die Erfassung der durch entsprechendes Anregungslicht induzierten, farbstoffspezifischen Fluoreszenzstrahlung bevorzugt. Je nach Emissionswellenlänge kann dabei die Fluoreszenz direkt makroskopisch oder mikroskopisch visuell erfaßt werden und gegebenenfalls dabei gleichzeitig durch bildgebende Detektionssysteme digital 20 aufgezeichnet und auf einem Bildschirm dargestellt werden.

Visuell erfaßbar ist Fluoreszenzstrahlung des Spektralbereiches 400 bis 650 nm. Besonders bevorzugt ist eine Wellenlänge von 450 bis 600 nm. Der besondere Vorteil der Verwendung des sichtbaren Bereiches des Lichtes besteht darin, daß 25 die Detektion der Fluoreszenz durch geringen technischen Aufwand möglich ist. Anregungslicht, das durch geeignete Laser oder Laserdioden erzeugt wird, wird in einen Lichtleiter eingekoppelt und über diesen an das zu diagnostizierende Areal herangeführt. Die Durchführung der intraoperativen Tumorranderkennung erfolgt durch großflächige Bestrahlung des Areals. Durch einen Filter (z. B. eine 30 Filterbrille, die durch die untersuchende Person getragen wird) wird das reflektierte Anregungslicht abgeblockt und nur die farbstoffspezifische Fluoreszenz beobachtet (makroskopische Beobachtung). Alternativ kann die Erfassung der Fluoreszenz durch ein Operationsmikroskop erfolgen

-6-

(mikroskopische Beobachtung). Durch die geringe Eindringtiefe von VIS-Licht in Gewebe (wenige Millimeter) können auf diese Weise oberflächlich lokalisierte Gefäßneubildungen erfaßt werden.

5 Ein weitererer Vorteil des Spektralbereiches des sichtbaren Lichtes besteht in der geringen Eindringtiefe in das Gewebe und Emission aus dem Gewebe. Hierdurch wird das detektierbare Signal nicht durch Signale aus tieferen Gewebsanteilen verfälscht und kann den oberflächlich sichtbaren Gewebsstrukturen genau zugeordnet werden.

10

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind somit auch Antikörper-Farbstoffkonjugate, deren Farbstoffe im sichtbaren Spektralbereich des Lichtes ein optisches Signal induzieren.

Die Verwendung von Antikörper-Farbstoffkonjugaten mit Farbstoffen, die im

15 Spektralbereich des Nahinfrarotlichtes (NIR; 600 – 900 nm) absorbieren, ermöglicht dagegen die Erkennung von Gefäßneubildung in tieferen Gewebebeschichten (bis zu 1 cm), da NIR-Licht schwächer von Gewebe absorbiert wird und daher eine größere Gewebeeindringtiefe besitzt. Die Beobachtung der Fluoreszenz ist visuell nicht möglich und kann durch CCD-Kameras (charge coupled device-Kamera) erfolgen, die über dem interessierenden Gewebeareal plaziert sind. Sowohl die makroskopische als auch mikroskopische Erfassung ist möglich. Der Vorteil der Verwendung von Farbstoffen in den Antikörper-Farbstoffkonjugaten, die im NIR-Spektralbereich absorbieren und fluoreszieren, kommt dann zum tragen, wenn eine Beurteilung 20 verdeckter Areale (z. B. durch Blut) erforderlich ist.

25

Aus photophysikalischer Sicht sind für die Antikörper-Farbstoffkonjugate solche Farbstoffe geeignet, die ein Absorptionsmaximum innerhalb des Spektralbereiches von 400 bis 800 nm und mindestens ein

30 Fluoreszenzmaximum innerhalb 500 bis 900 nm besitzen.

Ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Antikörper-Farbstoffkonjugate, die dadurch gekennzeichnet sind, daß der Farbstoff erst

-7-

unter Verwendung eines definierten Wellenlängenbereiches des sichtbaren oder nahinfraroten Lichtes ein Fluoreszenzsignal induziert.

Antikörper-Farbstoffkonjugate umfassend Farbstoffe mit visuell erfaßbarer

5 Fluoreszenz, sind beispielsweise solche aus folgenden Klassen:
Fluorescein, Fluorescein-isothiocyanat, Carboxyfluorescein oder Calcein,
Tetrabromfluoresceine oder Eosine, Tetraiodfluoresceine oder Erythrosine,
Difluorofluorescein, wie z. B. Oregon GreenTM 488, Oregon GreenTM 500 oder
Oregon GreenTM 514, Carboxyrhodol (Rhodol GreenTM)-Farbstoffe (US

10 5,227,487; US 5,442,045), Carboxyrhodamin-Farbstoffe (z. B. Rhodamine
GreenTM Dyes) (US 5,366,860),
4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-indacene, wie z. B. Bodipy FL, Bodipy 493/503
oder Bodipy 530/550 und Derivate davon (US 4,774,339, US 5,187,288, US
5,248,782, US 5,433,896, US 5,451,663),

15 Cyaninfarbstoffe, insbesondere Carbocyanine und Merocyanine,
Coumarinfarbstoffe, wie z. B. 7-Amino-4-methylcoumarin, Metallkomplexe von
DTPA oder Tetraaza-macrozylen (Cyclen, Pyclen) mit Terbium oder Europium
oder Tetrapyrrolfarbstoffe, insbesondere Porphyrine.

20 Antikörper-Farbstoffkonjugate umfassend Nahinfrarotfarbstoffe, sind
beispielsweise solche aus folgenden Klassen:
Polymethinfarbstoffe, wie Dicarbocyanin-, Tricarbocyanin-, Merocyanin- und
Oxonolfarbstoffe (WO 96/ 17628),
Rhodaminfarbstoffe,

25 Phenoxazin- oder Phenothiazinfarbstoffe,
Tetrapyrrolfarbstoffe, insbesondere Benzoporphyrine, Chorine und
Phthalocyanine.
Bevorzugte Nahinfrarotfarbstoffe in den Antikörper-Farbstoffkonjugaten sind die
Cyaninfarbstoffe mit Absorptionsmaxima zwischen 700 und 800 nm,

30 insbesondere Indodi- und Indotricarbocyanine.

Generell bevorzugt sind Farbstoffe in den Antikörper-Farbstoffkonjugaten aus o.
g. Klassen, die eine oder mehrere Carboxylgruppen besitzen, welche nach

-8-

chemischer Aktivierung an Aminogruppen von Antikörpern oder Antikörperfragmenten gekoppelt werden. Auch sind solche Derivate bevorzugt, die Maleimid- oder Bromalkylreste enthalten, so daß eine kovalente Kopplung an die Sulfhydrylgruppe der Aminosäure Cystein erfolgt.

5 Weiterhin sind Farbstoffe bevorzugt, die Isothiocyanat-Gruppen besitzen, welche ebenfalls mit Aminogruppen reagieren. Darüber hinaus müssen die Farbstoffe in den Antikörper-Farbstoffkonjugaten eine hohe Photostabilität besitzen und unter Bestrahlung mit Licht nicht ausbleichen (Photobleaching), um innerhalb des Untersuchungszeitraums ein 10 konstantes Signal zu gewährleisten.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind somit Antikörper-Farbstoffkonjugate, die sich im Randbereich des Zellgewebes eines Krankheitsherdes bevorzugt anreichern und damit den Randbereich des 15 Krankheitsherdes optisch darstellbar machen.

Insbesondere Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Antikörper-Farbstoffkonjugate der allgemeinen Formel I

20
$$B-(F)_n \quad (I),$$

in der
B für einen Antikörper oder ein Antikörperfragment mit hoher Bindung an ED-BFN steht,
F für einen Farbstoff aus der Klasse der Coumarine, der Fluoresceine, 25 Carboxyfluoresceine, der Difluorofluoresceine, der Tetrabromfluoresceine, der Tetraiodfluoresceine, der Rhodamine, der Carboxyrhodamine, der Carboxyrhodole, der 4,4-Difluoro-4-bora-3a, 4a-diaza-indacene, der Polymethinfarbstoffe oder der Tetrapyrrolfarbstoffe, oder der Terbium- oder Europiumkomplexe mit DTPA oder Cyclen und 30 dessen Derivaten steht
und
n für 1 bis 5 steht, bedeuten.

-9-

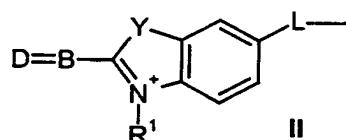
Besonders bevorzugt und damit ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Antikörper-Farbstoffkonjugate, deren Farbstoff ein Cyaninfarbstoff, ein Merocyaninfarbstoff, ein Oxonolfarbstoff, ein Styrylfarbstoff oder ein Squariliumfarbstoff ist.

5

Insbesondere bevorzugt und damit ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Antikörper-Farbstoffkonjugate, in denen der Farbstoffanteil ein Cyaninfarbstoff, insbesondere ein Carbocyanin, Dicarbocyanin oder Tricarbocyanin ist.

10

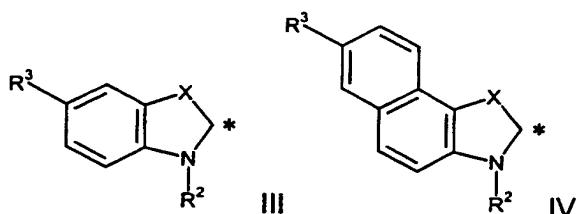
Die Erfindung betrifft somit insbesondere solche Antikörper-Farbstoffkonjugate, in denen der Farbstoff $-(F)_n$ der allgemeinen Formel I ein Cyaninfarbstoff der allgemeinen Formel II



15

ist, in der

D für einen Rest III oder IV

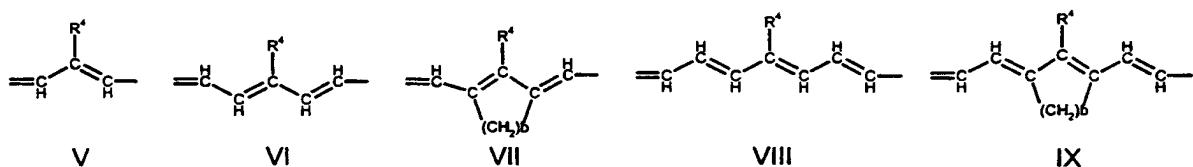


20

steht, wobei die mit einem Stern markierte Position die Verknüpfungsstelle mit dem Rest B bedeutet, und

B für die Gruppe V, VI, VII, VIII oder IX

25



stehen kann, in denen

R¹ und R² C₁-C₄-Sulfoalkyl, eine gesättigte oder ungesättigte, verzweigte
 5 oder lineare C₁-C₅₀-Alkylkette bedeutet, die gegebenenfalls mit bis zu
 15 Sauerstoffatomen, und/oder mit bis zu 3 Carbonylgruppen,
 und/oder mit bis zu 5 Hydroxygruppen substituiert sein kann,
R³ für die Gruppe -COOE¹, -CONE¹E², -NHCOE¹, -NHCONHE¹,
 -NE¹E², -OE¹, -OSO₃E¹, -SO₃E¹, -SO₂NHE¹ oder -E¹ steht, wobei
E¹ und E² unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom, C₁-C₄-
 Sulfoalkyl, gesättigtes oder ungesättigtes, verzweigtes oder
 10 geradkettiges C₁-C₅₀-Alkyl steht, das gegebenenfalls mit bis zu 15
 Sauerstoffatomen, und/oder bis zu 3 Carbonylgruppen
 unterbrochen, und/oder mit bis zu 5 Hydroxygruppen substituiert
 15 sein kann,
R⁴ für ein Wasserstoffatom oder ein Fluor- Chlor, Brom- oder Iodatom
 steht,
b für 2 oder 3 steht,
X für Sauerstoff, Schwefel oder die Gruppe =C(CH₃)₂ oder -
 20 (CH=CH)- steht,
 und
L für eine direkte Bindung oder einen Linker, der eine geradkettige
 oder verzweigte Kohlenstoffkette mit bis zu 20 Kohlenstoffatomen,
 welche mit einer oder mehreren -OH, -COOH, SO₃-Gruppen
 25 substituiert, und/ oder gegebenenfalls ein oder mehrfach durch
 eine -O-, -S-, -CO-, -CS-, -CONH-, -NHCO-, -NHCSNH-, -SO₂-,
 PO₄⁻ oder eine -NH-Gruppen oder einen Arylring unterbrochen
 sein kann, steht.

-11-

Die erfindungsgemäßen Antikörper-Farbstoffkonjugate können entweder alleine oder in Formulierung als Arzneimittel zur Anwendung kommen.

Zur Verwendung der Antikörper-Farbstoffkonjugate als Arzneimittel werden

5 diese in die Form eines pharmazeutischen Präparats gebracht, das neben dem Antikörper-Farbstoffkonjugat für die enterale oder parenterale Applikation geeignete pharmazeutische, organische oder anorganische inerte Trägermaterialien, wie zum Beispiel, Wasser, Gelatine, Gummi arabicum, Milchzucker, Stärke, Magnesiumstearat, Talk, pflanzliche Öle,

10 Polyalkylenglykole usw. enthält. Die pharmazeutischen Präparate können in fester Form, zum Beispiel als Tabletten, Dragees, Suppositorien, Kapseln oder in flüssiger Form, zum Beispiel als Lösungen, Suspensionen oder Emulsionen vorliegen. Gegebenenfalls enthalten sie darüber hinaus Hilfsstoffe wie Konservierungsmittel, Stabilisierungsmittel, Netzmittel oder Emulgatoren, Salze

15 zur Veränderung des osmotischen Drucks oder Puffer.

Für die parenterale Anwendung sind Injektionslösungen oder Suspensionen, insbesondere wässrige Lösungen der Antikörper-Farbstoffkonjugate geeignet.

20 Als Trägersysteme können auch grenzflächenaktive Hilfsstoffe wie Salze der Gallensäuren oder tierische oder pflanzliche Phospholipide, aber auch Mischungen davon sowie Liposome oder deren Bestandteile verwendet werden. Für die orale Anwendung sind insbesondere Tabletten, Dragees oder Kapseln mit Talkum und/oder Kohlenwasserstoffträger oder -binder, wie zum Beispiel

25 Lactose, Mais- oder Kartoffelstärke, geeignet. Die Anwendung kann auch in flüssiger Form erfolgen, wie zum Beispiel als Saft, dem gegebenenfalls ein Süßstoff beigefügt ist.

Die Dosierung der Antikörper-Farbstoffkonjugate kann je nach Verabfolgungsweg, Alter und Gewicht des Patienten, Art und Schwere der zu

30 behandelnden Erkrankung und ähnlichen Faktoren variieren. Die anwendbare Dosis der Antikörper-Farbstoffkonjugate zur Erkennung der Grenzbereiche beträgt 0,5-1000 mg, vorzugsweise 50-200 mg, wobei die Dosis als einmal zu

-12-

verabreichende Einzeldosis oder unterteilt in 2 oder mehreren Tagesdosen gegeben werden kann.

Die oben beschriebenen Formulierungen und Darreichungsformen sind ebenfalls

5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Somit betrifft die Erfindung auch pharmazeutische Mittel, die ein oder mehrere Antikörper-Farbstoffkonjugate umfassen, zur intraoperativen Darstellung der Randbereiche eines Krankheitsherdes, wobei die pharmazeutischen Mittel entweder alleine oder in Mischung mit geeigneten Lösungsmitteln, Puffern und/

10 oder Trägerstoffen zur Anwendung kommen.

Die erfindungsgemäßen Antikörper-Farbstoffkonjugate kommen bei der chirurgischen Behandlung von angiogeneseabhängigen Erkrankungen, wie malignen Tumoren und deren Metastasen, benignen Tumoren, präkanzeröse

15 Gewebsveränderungen, Endometriose, Hämangiomen, extrauterinen Schwangerschaften zum Einsatz.

Ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der Antikörper-Farbstoffkonjugate und Mittel zur intraoperative Darstellung von

20 Krankheitsherden, insbesondere zur mikro- und makroskopischen, intraoperativen Darstellung der Randbereiche eines Krankheitsherdes, sowie die Verwendung der Antikörper-Farbstoffkonjugate zur Herstellung eines Mittels für chirurgische Behandlungen von angiogeneseabhängigen Erkrankungen, wie malignen Tumoren und deren Metastasen, benignen Tumoren, präkanzeröse

25 Gewebsveränderungen, Endometriose, Hämangiomen und extrauterinen Schwangerschaften.

Herstellung der Farbstoffe

30

Die Herstellung der Farbstoffe erfolgt nach literaturbekannten Methoden.

Geeignete Farbstoffe für die Herstellung der Antikörper-Farbstoffkonjugate sind Farbstoffe Carboxylgruppen oder Isothiocyanatgruppen zur kovalenten

-13-

Kopplung an Aminogruppen des Antikörpers. Besonders bevorzugt sind hierbei Cyaninfarbstoffe (Mujumdar SR et al. (1996) 7: 356-362; Flanagan JH et al. (1997) 8: 751-756 und Licha K et al. (1996) Proc SPIE Vol 2927, 192-198).

- 5 Die Farbstoffe mit Carboxylgruppen werden zunächst durch Überführung in einen reaktiven Ester (z. B. N-Hydroxysuccinimidester) nach an sich bekannten Methoden aktiviert. Farbstoffe mit Isothiocyanatgruppen können direkt eingesetzt werden. Die reaktiven Derivate werden dann in Pufferlösung oder Gemischen aus organischem Lösungsmittel (z. B. Dimethylformamid (DMF) oder Dimethylsulfoxid (DMSO)) und Pufferlösung mit dem Antikörper zur Reaktion gebracht. Dabei wird ein 3 bis 100-facher molarer Überschuß an Farbstoff verwendet. Der nicht reagierte Anteil wird nach beendeter Reaktion durch Ultrafiltration und/oder Chromatographie abgetrennt.
- 10
- 15 In analoger Verfahrensweise wird auch folgender Farbstoff hergestellt:

Herstellungsbeispiel 1

20

Bis-1,1'-(4-sulfobutyl)indocarbocyanin-5-carbonsäure-N-hydroxysuccinimidester

Die Herstellung von Bis-1,1'-(4-sulfobutyl)indocarbocyanin-5-carbonsäure erfolgt ausgehend von 1-(4-Sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl-3H-indolenin und 1-(4-Sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl-5-carboxy-3H-indolenin (Cytometry 10, 11-19, 1989, Talanta 39, 505-510, 1992) in Anlehnung an literaturbekannte Methoden.

25 Zur Überführung in den N-Hydroxysuccinimidester wird 0,1 mmol Farbstoff (67 mg in 10 ml DMF) mit jeweils 0,5 mmol N-Hydroxysuccinimid und Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) versetzt und 24 h bei Raumtemperatur gerührt.

30 Nach Zugabe von 50 ml Ether wird der ausgefallene Feststoff abfiltriert, erneut je zweimal in wenig DDF gelöst und mit Ether gefällt und schließlich im Vakuum getrocknet (Ausbeute 89%).

35

-14-

Herstellung des Antikörper-Farbstoffkonjugats

Herstellung eines Bis-1,1'-(4-sulfobutyl)indocarbocyanin-Konjugates mit L19-

5 Antikörper

Der Antikörper L19 (1 mg in 1 ml Natriumacetat-Puffer 50 mM, pH 8,2)) wird mit N-Hydroxysuccinimidester (75 µmol einer Lösung von 4 mg/ml in DMSO) versetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufreinigung erfolgt mittels
10 Gelfiltration über PD10-Kartuschen (Pharmacia) und Aufkonzentration mittels Centricon-10 tubes (Amicon) unter Erhalt einer Lösung von ca. 1 mg/ml Antikörper.

Absorptionsmaximum: 555 nm

Fluoreszenzmaximum: 582 nm.

15

-15-

Das nachfolgenden Beispiel erläutern die biologische Anwendbarkeit der erfindungsgemäßen Antikörper-Farbstoffkonjugate ohne diese auf die Anwendungsbeispiele zu beschränken.

5 Anwendungsbeispiel 1

In-vivo-Fluoreszenzbildgebung an tumortragenden Nacktmäusen und mikroskopische Ex-vivo-Untersuchung des Tumorgewebes

- 10 Die bildgebenden Eigenschaften der erfindungsgemäßen Verbindungen wurden in vivo nach Injektion in tumortragenden Nacktmäusen untersucht. Dazu wird 0,1 µmol/kg bis 2 µmol/kg der Substanz intravenös appliziert und die Anreicherung in der Tumorregion in einem Zeitraum von 0 bis 48 Stunden beobachtet. Die Fluoreszenz der Substanzen wird durch Bestrahlung der Tiere
- 15 mit Licht entsprechender Wellenlänge, das mit einem Laser (Diodenlaser, Festkörperlaser) monochromatisch erzeugt wird oder durch Filter aus der polychromatischen Emission einer Hg- oder Xe-Lampe herausgefiltert wird, induziert. Im Fall der im Herstellungsbeispiel 1 beschriebenen Verbindung wird aus einem Nd:YAG Laser Licht der Wellenlänge 540 nm zur Anregung zur
- 20 Ausleuchtung des Versuchstieres verwendet und die Fluoreszenzstrahlung bei einer Wellenlänge von >580 nm durch eine intensivierte CCD-Kamera unter Erhalt von Ganzkörperfluoreszenzaufnahmen detektiert. Parallel wird die Fluoreszenz visuell und photographisch erfasst. Aus dem Tumormaterial werden Schnitte angefertigt und mikroskopisch untersucht (Zeiss Axiovert Mikroskop mit Cy3-Filtersatz).
- 25 Nach Injektion von 1 µmol/kg des im Herstellungsbeispiel genannten Antikörper-Farbstoffkonjugates in F9-Teratokarzinomtragenden Nacktmäusen konnte nach 4 h ein erhöhtes Fluoreszenzsignal im Vergleich zu Normalgewebe anhand von Ganzkörperfluoreszenzaufnahmen detektiert werden.
- 30 Nach Präparation der Haut und der obersten Gewebeschichten des Tumors kann die Fluoreszenz den Randbereichen des Tumors zugeordnet werden. Die mikroskopische Beurteilung von Tumorschnitten ergibt eine erhöhte Fluoreszenz, die mit Blutgefäßen des Tumorrandbereiches korreliert.

Patentansprüche

1. Antikörper-Farbstoffkonjugate, dadurch gekennzeichnet, daß sie sich im Randbereich des Zellgewebes eines Krankheitsherdes bevorzugt anreichern und damit den Randbereich des Krankheitsherdes optisch darstellbar machen.
5
2. Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß Anspruch 1, der allgemeinen Formel I
10
$$B-(F)_n \quad (I),$$

in der

B für einen Antikörper oder ein Antikörperfragment mit hoher Bindung an EDB-Fibronektin steht,

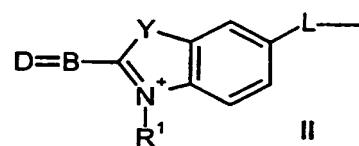
15 F für einen Farbstoff aus der Klasse der Coumarine, der Fluoresceine, Carboxyfluoresceine, der Difluorofluoresceine, der Tetrabromfluoresceine, der Tetraiodfluoresceine, der Rhodamine, der Carboxyrhodamine, der Craboxyrhodole, der 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-indacene, der Polymethinfarbstoffe oder der Tetrapyrrolfarbstoffe, oder der Terbium- oder Europiumkomplexe mit DTPA oder Cyclen und dessen Derivaten steht

20 und

n für 1 bis 5 steht, bedeuten.
- 25 3. Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Farbstoff ein Cyaninfarbstoff, ein Merocyaninfarbstoff, ein Oxonolfarbstoff, ein Styrylfarbstoff oder ein Squariliumfarbstoff ist.
- 30 4. Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Farbstoff ein Cyaninfarbstoff wie Carbocyanin, Dicarbocyanin oder Tricarbocyanin ist.

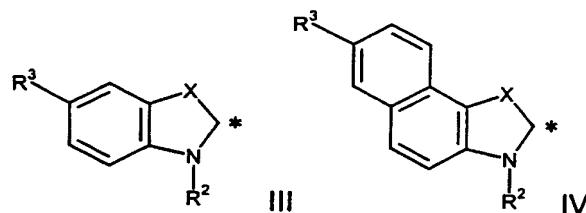
5. Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Farbstoff $-(F)_n$ der allgemeinen Formel I ein Cyaninfarbstoff der allgemeinen Formel II

5



ist, in der

D für einen Rest III oder IV

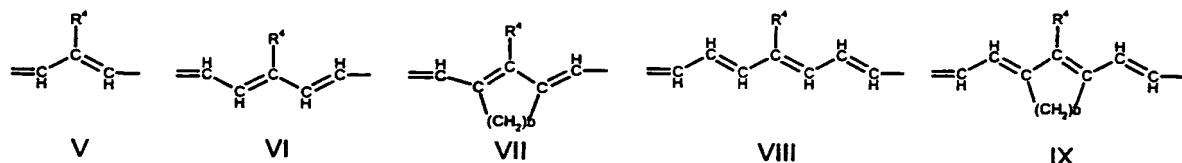


10

steht, wobei die mit einem Stern markierte Position die Verknüpfungsstelle mit dem Rest B bedeutet, und

B für die Gruppe V, VI, VII, VIII oder IX

15



stehen kann, in denen

20 R^1 und R^2 C₁-C₄-Sulfoalkyl, eine gesättigte oder ungesättigte, verzweigte oder lineare C₁-C₅₀-Alkylkette bedeutet, die gegebenenfalls mit bis zu 15 Sauerstoffatomen, und/oder mit bis zu 3 Carbonylgruppen, und/oder mit bis zu 5 Hydroxygruppen substituiert sein kann,

-18-

R³ für die Gruppe -COOE¹, -CONE¹E², -NHCOE¹,
 -NHCONHE¹, -NE¹E², -OE¹, -OSO₃E¹, -SO₃E¹, -SO₂NHE¹
 oder -E¹ steht,
 wobei

5 E¹ und E² unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom, C₁-C₄-
 Sulfoalkyl, gesättigtes oder ungesättigtes, verzweigtes oder
 geradkettiges C₁-C₅₀-Alkyl steht, das gegebenenfalls mit bis zu
 15 Sauerstoffatomen, und/oder bis zu 3 Carbonylgruppen
 unterbrochen, und/oder mit bis zu 5 Hydroxygruppen
 10 substituiert sein kann,

10 R⁴ für ein Wasserstoffatom oder ein Fluor- Chlor, Brom- oder
 Iodatom steht,

b für 2 oder 3 steht,

15 X für Sauerstoff, Schwefel oder die Gruppe =C(CH₃)₂ oder
 -(CH=CH)- steht,
 und

15 L für eine direkte Bindung oder einen Linker, der eine
 geradkettige oder verzweigte Kohlenstoffkette mit bis zu 20
 Kohlenstoffatomen, welche mit einer oder mehreren -OH, -
 20 COOH, SO₃-Gruppen substituiert, und/ oder gegebenenfalls
 ein oder mehrfach durch eine -O-, -S-, -CO-, -CS-, -CONH-,
 -NHCO-, -NHCSNH-, -SO₂-, PO₄³⁻ oder eine -NH-Gruppen
 oder einen Arylring unterbrochen sein kann, steht.

25 6. Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch
 gekennzeichnet, daß als Antikörper die Antikörper L19 und E8 verwendet
 werden.

30 7. Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch
 gekennzeichnet, daß der Farbstoff im sichtbaren Spektralbereich des
 Lichtes ein optisches Signal induziert.

-19-

8. Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Farbstoff erst unter Verwendung eines definierten Wellenlängenbereiches des sichtbaren oder nahinfraroten Lichtes ein Fluoreszenzsignal induziert.
- 5
9. Pharmazeutisches Mittel, umfassend ein oder mehrere Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 8, zur intraoperativen Darstellung der Randbereiche eines Krankheitsherdes.
- 10 10. Pharmazeutisches Mittel gemäß Anspruch 9, in Mischung mit geeigneten Lösungsmitteln, Puffern und/ oder Trägerstoffen.
11. Verwendung der Antikörper-Farbstoffkonjugate und Mittel gemäß den Ansprüchen 1 bis 10 zur intraoperativen Darstellung von
- 15 Krankheitsherden.
12. Verwendung der Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 10 zur intraoperativen Darstellung der Randbereiche eines Krankheitsherdes.
- 20
13. Verwendung der Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 10 zur mikro- und makroskopischen, intraoperativen Darstellung der Randbereiche eines Krankheitsherdes.
- 25 14. Verwendung der Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 8 zur Herstellung eines Mittels zur chirurgischen Behandlung von angiogeneseabhängigen Erkrankungen, wie malignen Tumoren und deren Metastasen, benignen Tumoren, präkanzeröse Gewebsveränderungen, Endometriose, Hämangiomen und extrauterinen Schwangerschaften.
- 30



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP 00/08121A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K49/00 //C07K16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, MEDLINE, WPI Data, EPO-Internal, PAJ, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NERI DARIO ET AL: "Targeting by affinity-matured recombinant antibody fragments of an angiogenesis associated fibronectin isoform." NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 15, no. 12, 1997, pages 1271-1275, XP002124779 ISSN: 1087-0156 cited in the application abstract page 1271, column 2, paragraph 2 -page 1273, column 1, paragraph 5 page 1273, column 2, paragraph 4 -page 1274, paragraph 1 page 1274, column 2, last paragraph -page 1275, column 1, paragraph 1	1-10
Y		11-14 -/-

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 November 2000

Date of mailing of the international search report

22/11/2000

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Muller-Thomalla, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/08121

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VITI F ET AL: "Increased binding affinity and valence of recombinant antibody fragments lead to improved targeting of tumoral angiogenesis." CANCER RESEARCH, (1999 JAN 15) 59 (2) 347-52. , XP002124782 cited in the application abstract figure 4 page 351, column 1, last paragraph -column 2, paragraph 1	1-10 11-14
X	MARIANI G ET AL: "Tumor targeting potential of the monoclonal antibody BC-1 against oncofetal fibronectin in nude mice bearing human tumor implants." CANCER, (1997 DEC 15) 80 (12 SUPPL) 2378-84. , XP000960444 page 2378, column 2, line 1 -page 2379, column 1, paragraph 4 page 2379, column 2, last paragraph -page 2380, column 1, paragraph 1 page 2381, column 1, last paragraph -page 2383, column 1, paragraph 1	1-10 11-14
X	CASTELLANI P ET AL: "The fibronectin isoform containing the ED-B oncofetal domain: a marker of angiogenesis 'published erratum appears in Int J Cancer 1995 Jul 4;62(1):118!.' INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, (1994 DEC 1) 59 (5) 612-8. , XP000960445 page 612, column 2, paragraph 3 page 614, column 1, paragraph 2 -column 2, paragraph 1 page 616, column 1, paragraph 3 -column 2, paragraph 2	1-10 11-14
Y	POON ET AL: "Laser-induced fluorescence: experimental intraoperative delineation of tumor resection margins" STN CAPLUS,XX,XX, vol. 25, no. 116, 22 June 1992 (1992-06-22), XP002076252 abstract	11-14
Y	US 4 341 223 A (LUTZ LAURALEE A) 27 July 1982 (1982-07-27) column 1, line 1 -column 2, line 66 claims 5-13	11-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Information on application No
PCT/EP/00/08121

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4341223	A 27-07-1982	NONE	



INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationaler Aktenzeichen
PCT/EP 00/08121

A. KLASSEIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K49/00 //C07K16/18

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, MEDLINE, WPI Data, EPO-Internal, PAJ, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	NERI DARIO ET AL: "Targeting by affinity-matured recombinant antibody fragments of an angiogenesis associated fibronectin isoform." NATURE BIOTECHNOLOGY, Bd. 15, Nr. 12, 1997, Seiten 1271-1275. XP002124779 ISSN: 1087-0156 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 1271, Spalte 2, Absatz 2 -Seite 1273, Spalte 1, Absatz 5 Seite 1273, Spalte 2, Absatz 4 -Seite 1274, Absatz 1 Seite 1274, Spalte 2, letzter Absatz -Seite 1275, Spalte 1, Absatz 1	1-10
Y	-/-	11-14

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzipiell oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

13. November 2000

22/11/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Muller-Thomalla, K

INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/08121

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	VITI F ET AL: "Increased binding affinity and valence of recombinant antibody fragments lead to improved targeting of tumoral angiogenesis." CANCER RESEARCH, (1999 JAN 15) 59 (2) 347-52. , XP002124782 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Abbildung 4 Seite 351, Spalte 1, letzter Absatz -Spalte 2, Absatz 1	1-10 11-14
X	MARIANI G ET AL: "Tumor targeting potential of the monoclonal antibody BC-1 against oncofetal fibronectin in nude mice bearing human tumor implants." CANCER, (1997 DEC 15) 80 (12 SUPPL) 2378-84. , XP000960444 Seite 2378, Spalte 2, Zeile 1 -Seite 2379, Spalte 1, Absatz 4 Seite 2379, Spalte 2, letzter Absatz -Seite 2380, Spalte 1, Absatz 1 Seite 2381, Spalte 1, letzter Absatz -Seite 2383, Spalte 1, Absatz 1	1-10 11-14
X	CASTELLANI P ET AL: "The fibronectin isoform containing the ED-B oncofetal domain: a marker of angiogenesis 'published erratum appears in Int J Cancer 1995 Jul 4;62(1):118!.' INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, (1994 DEC 1) 59 (5) 612-8. , XP000960445 Seite 612, Spalte 2, Absatz 3 Seite 614, Spalte 1, Absatz 2 -Spalte 2, Absatz 1 Seite 616, Spalte 1, Absatz 3 -Spalte 2, Absatz 2	1-10 11-14
Y	POON ET AL: "Laser-induced fluorescence: experimental intraoperative delineation of tumor resection margins" STN CAPLUS, XX, XX, Bd. 25, Nr. 116, 22. Juni 1992 (1992-06-22), XP002076252 Zusammenfassung	11-14
Y	US 4 341 223 A (LUTZ LAURALEE A) 27. Juli 1982 (1982-07-27) Spalte 1, Zeile 1 -Spalte 2, Zeile 66 Ansprüche 5-13	11-14

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zu der Patentfamilie gehören

Patent-Aktenzeichen

PCT/EP 00/08121

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 4341223 A	27-07-1982	KEINE	



**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM
GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

REC'D 17 JAN 2002

WIPO PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT) **T 13**

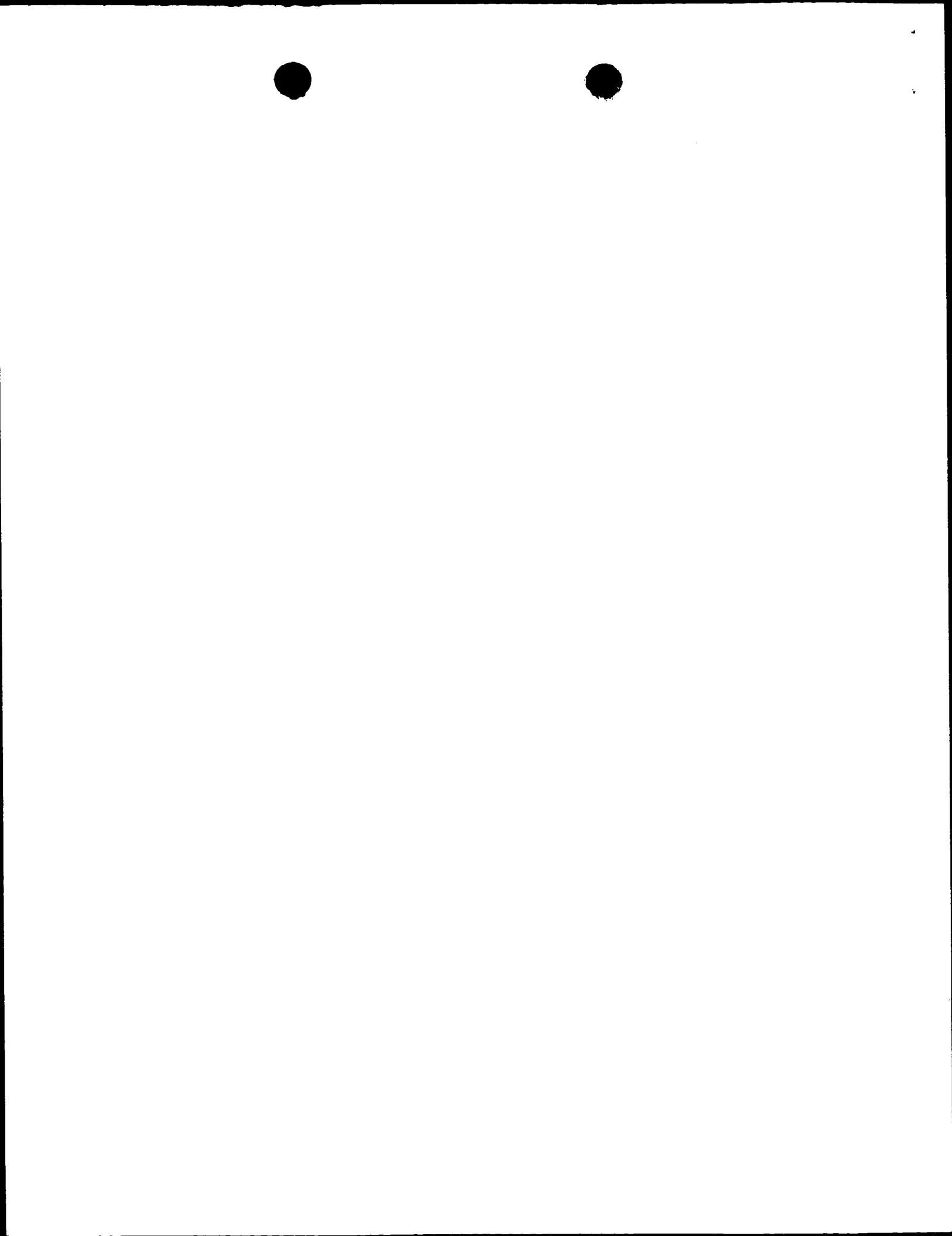
Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 51739AWOM1XX	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08121	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 19/08/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 24/09/1999	
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK A61K49/00			
Anmelder SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT			

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 8 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 4 Blätter.
3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:
 - I Grundlage des Berichts
 - II Priorität
 - III Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
 - IV Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
 - V Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderlichen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
 - VI Bestimmte angeführte Unterlagen
 - VII Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
 - VIII Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 16/02/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 15.01.2002
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Büttner, U Tel. Nr. +49 89 2399 7841





INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08121

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*): **Beschreibung, Seiten:**

1-14 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-13 eingegangen am 21/11/2001 mit Schreiben vom 21/11/2001

2. **Hinsichtlich der Sprache:** Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- Beschreibung, Seiten:
- Ansprüche, Nr.:
- Zeichnungen, Blatt:



**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08121

5. Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).
siehe Beiblatt

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

die gesamte internationale Anmeldung.
 Ansprüche Nr. 4,13, 10-12 (in bezug auf gewerbliche Anwendbarkeit).

Begründung:

Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 10-12 beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
siehe Beiblatt

Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. 4 sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
siehe Beiblatt

Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 13 sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
 Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:

Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.
 Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung



**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08121

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 5 Nein: Ansprüche 1-3, 6-12
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche Nein: Ansprüche 1-3, 5-12
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1-9, 13 Nein: Ansprüche

**2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt**



Zu Punkt I

Grundlage des Berichts

Die mit Schreiben vom 21.11.2001 eingereichten Änderungen bringen Sachverhalte ein, die im Widerspruch zu Artikel 34 (2) b) PCT über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgehen. Es handelt sich dabei um folgende Änderungen:

Der Platzhalter Y im Anspruch 4 ist in der ursprünglich eingereichten Anmeldung nicht definiert. Auch wenn die unvollständige Wiedergabe als solches ein offensichtlicher Tippfehler ist, so ist die mit dem Schreiben vom 21.11.2001 gegebene Definition jedoch nicht derart offensichtlich, daß sofort erkennbar ist, daß nichts anderes beabsichtigt sein konnte (Regel 91 PCT).

Für die Prüfung wird daher, anstelle des mit dem Schreiben vom 21.11.2001 eingereichten Anspruchs 4, der ursprünglich eingereichte Anspruch 5 berücksichtigt.

Zu Punkt III

Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

Die Ansprüche 10-12 beziehen sich auf einen Gegenstand, der nach Auffassung dieser Behörde unter die Regel 67.1 (iv) PCT fällt. Daher wird über die gewerbliche Anwendbarkeit des Gegenstands dieser Ansprüche kein Gutachten erstellt (Artikel 34(4) a) (i) PCT).

Der Gegenstand des Anspruchs 5 (ursprüngliche Anmeldung, entspricht Anspruch 4 mit dem Schreiben vom 21.11.2001) ist nicht klar. Der Platzhalter Y der allgemeinen Formel II ist nicht definiert. Somit sind ebenfalls die auf diesen Anspruch rückbezogenen Ansprüche 5-13 (mit Schreiben vom 21.11.2001) nicht klar. Für die Prüfung der Ansprüche 5-13 wird die Abhängigkeit auf Anspruch 4 nicht berücksichtigt.

Außerdem ist Anspruch 13 nicht von der Beschreibung gestützt. Gemäß der Beschreibung, können die beanspruchten Verbindungen lediglich zur Darstellung



von angiogeneseabhängigen Erkrankungen verwendet werden, nicht aber zu einer therapeutischen Behandlung selbst. Eine eingehendere Prüfung des Anspruchs 13 kann daher nicht durchgeführt werden.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erforderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

- D1: NERI DARIO ET AL: 'Targeting by affinity-matured recombinant antibody fragments of an angiogenesis associated fibronectin isoform.' NATURE BIOTECHNOLOGY, Bd. 15, Nr. 12, 1997, Seiten 1271-1275, XP002124779 ISSN: 1087-0156 in der Anmeldung erwähnt
- D2: VITI F ET AL: 'Increased binding affinity and valence of recombinant antibody fragments lead to improved targeting of tumoral angiogenesis.' CANCER RESEARCH, (1999 JAN 15) 59 (2) 347-52. , XP002124782 in der Anmeldung erwähnt
- D3: MARIANI G ET AL: 'Tumor targeting potential of the monoclonal antibody BC-1 against oncofetal fibronectin in nude mice bearing human tumor implants.' CANCER, (1997 DEC 15) 80 (12 SUPPL) 2378-84. , XP000960444

Neuheit

Ansprüche 1-3, 6-12

Die vorliegenden Ansprüche 1-3, 6-12 sind nicht neu gemäß Artikel 33(2) PCT.

D1 (S. 1273, linke Spalte, 1. Abschnitt) und D3 (S. 2379, linke Spalte, vorletzter Abschnitt) beschreiben Antikörperfragmente mit hoher Bindung an EDB-Fibronektin, die mit CY7, einem Cyaninfarbstoff, der im sichtbaren bzw. nahinfraroten Licht ein Fluoreszenzsignal induziert, markiert sind. Mit Hilfe dieser Antikörper werden Tumore optisch dargestellt.

Das Merkmal von Anspruch 1, daß sich die Farbstoffkonjugate bevorzugt im Randbereich des Krankheitsherdes anreichern, ist nicht klar genug, um ein Unterscheidungsmerkmal gegenüber D1 darzustellen. Aus Abbildungen 1-3, Seite 1272 (D1) geht hervor, daß sich die in D1 beschriebenen Antikörper auch im



Randbereich anreichern.

Somit ist der Gegenstand der Ansprüche 1-3, 6-12 nicht neu (Artikel 33(2) PCT).

Anspruch 5

Anspruch 5 beschreibt die Konjugation der Antikörper L19 oder E8 mit Farbstoffen.

D2 beschreibt den Antikörper L19 mit einer Radiomarkierung. Die Verwendung von Farbstoffen ist nicht direkt beschrieben. Somit ist der Gegenstand des Anspruchs 5 neu (Artikel 33(2) PCT).

Erfinderische Tätigkeit

Anspruch 5

D2 beschreibt die Verwendung des radiomarkierten Antikörpers L19 zur Darstellung von Tumoren (angiogeneser Bereiche). Vor allem neubildende Blutgefäße werden markiert (siehe Seite 349, Biodistribution studies, Fig. 4). Die Neubildung der Blutgefäße findet vor allem im Randbereich des Krankheitsherdes statt (siehe auch vorliegende Anmeldung, Seite 1, Zeile 15-16). Somit wird impliziert, daß Antikörper, die neubildende Gefäße markieren, auch den Randbereich eines Tumors markieren.

Die vorliegende Anmeldung unterscheidet in der Verwendung von Farbstoffkonjugaten.

Die von DER Anmeldung zu lösende Aufgabe besteht somit in der Bereitstellung von alternativen spezifischen markierten Antikörperkonjugaten zur Darstellung von angiogeneser Bereichen (Randbereich eines Tumors).

Der Autor von D2 schlägt vor, den Antikörper L19 mit Farbstoffen zu konjugieren um ihn mit Hilfe von IR-Fluoreszenzmethoden für die Erkennung von Angiogenese in Patienten zu verwenden (S. 351, rechte Spalte). Er verweist dabei auf D1.

Da weder D1 noch D2 noch ein anderer Stand der Technik, Hindernisse für den Austausch der radioaktiven Markierung mit einer Farbstoffmarkierung beschreiben, wäre es für den Fachmann somit selbstverständlich den Antikörper L19 mit einem wie in D1 beschriebenen Farbstoff zu kombinieren.

Daher entspricht der Gegenstand des Anspruchs 5 nicht den Erfordernissen des Artikels 33(3) PCT.



Gewerbliche Anwendbarkeit

Ansprüche 10-13

Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden Ansprüche 10-13 gewerblich anwendbar sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

Ansprüche 1-9

Ansprüche 1-9 erfüllen die Erfordernisse des Artikels 33(4) PCT.



Patentansprüche

EPO-BERLIN

21-11-2001

1. Antikörper-Farbstoffkonjugate, die sich im Randbereich des Zellgewebes eines Krankheitsherdes bevorzugt anreichern und damit den Randbereich des 5 Krankheitsherdes optisch darstellbar machen, dadurch gekennzeichnet, daß der Farbstoff eine Verbindung der allgemeinen Formel I

$B-(F)_n$ (I),

in der

10 B für einen Antikörper oder ein Antikörperfragment mit hoher Bindung an EDB-Fibronectin steht,

F für einen Farbstoff aus der Klasse der Coumarine, der Fluoresceine, Carboxyfluoresceine, der Difluorofluoresceine, der 15 Tetrabromfluoresceine, der Tetraiodfluoresceine, der Rhodamine, der Carboxyrhodamine, der Carboxyrhodole, der 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-indacene, der Polymethinfarbstoffe oder der Tetrapyrrolfarbstoffe, oder der Terbium- oder Europiumkomplexe mit DTPA oder Cyclen und dessen Derivaten steht

und

20 n für 1 bis 5 steht, ist.

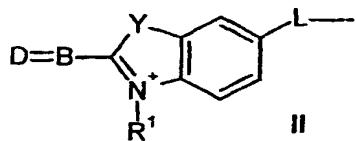
2. Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Farbstoff ein Cyaninfarbstoff, ein Merocyaninfarbstoff, ein 25 Oxonolfarbstoff, ein Styrylfarbstoff oder ein Squariliumfarbstoff ist.

3. Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Farbstoff ein Cyaninfarbstoff wie Carbocyanin, Dicarbocyanin oder Tricarbocyanin ist.



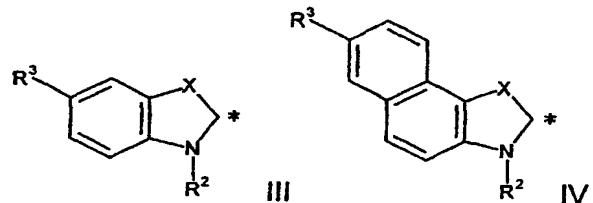
4. Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Farbstoff $-(F)_n$ der allgemeinen Formel I ein Cyaninfarbstoff der allgemeinen Formel II

5



ist, in der

D für einen Rest III oder IV

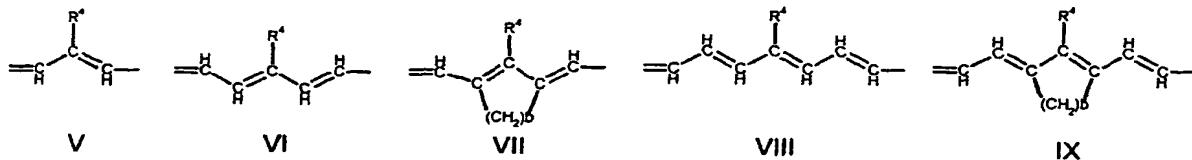


10

steht, wobei die mit einem Stern markierte Position die Verknüpfungsstelle mit dem Rest B bedeutet, und

B für die Gruppe V, VI, VII, VIII oder IX

15



stehen kann, in denen

R¹ und R² C₁-C₄-Sulfoalkyl, eine gesättigte oder ungesättigte, verzweigte oder lineare C₁-C₅₀-Alkylkette bedeutet, die gegebenenfalls mit bis zu 15 Sauerstoffatomen, und/oder mit bis zu 3 Carbonylgruppen, und/oder mit bis zu 5 Hydroxygruppen substituiert sein kann,

20



5 R³ für die Gruppe -COOE¹, -CONE¹E², -NHCOE¹, -NHCONHE¹,
 -NE¹E², -OE¹, -OSO₃E¹, -SO₃E¹, -SO₂NHE¹ oder -E¹ steht,
 wobei

10 E¹ und E² unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom, C₁-C₄-
 Sulfoalkyl, gesättigtes oder ungesättigtes, verzweigtes oder
 geradkettiges C₁-C₅₀-Alkyl steht, das gegebenenfalls mit bis zu 15
 Sauerstoffatomen, und/oder bis zu 3 Carbonylgruppen
 unterbrochen, und/oder mit bis zu 5 Hydroxygruppen substituiert
 sein kann,

15 R⁴ für ein Wasserstoffatom oder ein Fluor- Chlor, Brom- oder
 Iodatom steht,

20 b für 2 oder 3 steht,

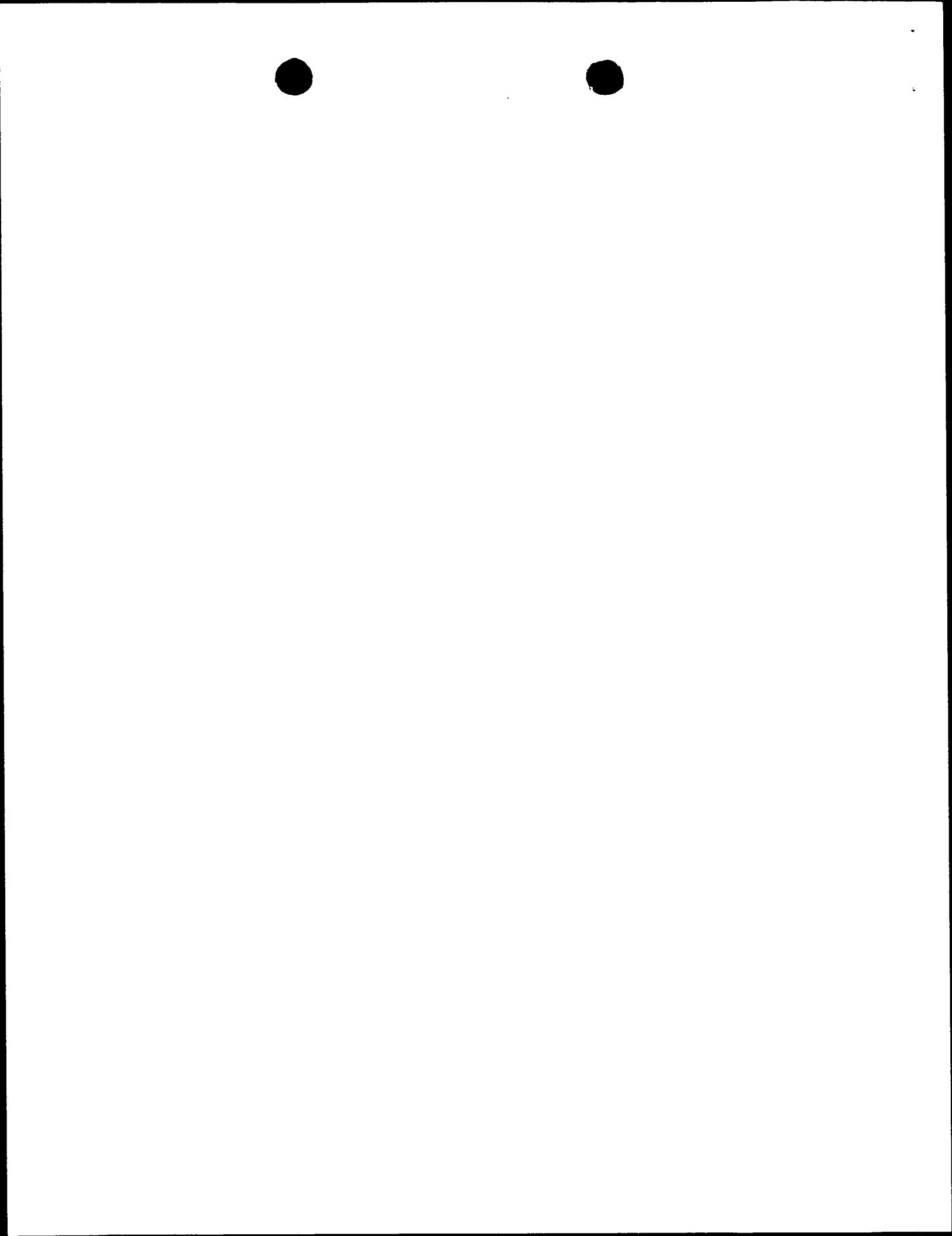
25 X und Y für Sauerstoff, Schwefel oder die Gruppe =C(CH₃)₂ oder
 -(CH=CH)- steht,
 und

30 L für eine direkte Bindung oder einen Linker, der eine geradkettige
 oder verzweigte Kohlenstoffkette mit bis zu 20
 Kohlenstoffatomen, welche mit einer oder mehreren -OH, -
 COOH, SO₃-Gruppen substituiert, und/ oder gegebenenfalls ein
 oder mehrfach durch eine -O-, -S-, -CO-, -CS-, -CONH-,
 -NHCO-, -NHCSNH-, -SO₂-, PO₄³⁻ oder eine -NH-Gruppen oder
 einen Arylring unterbrochen sein kann, steht.

5. Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch
 gekennzeichnet, daß als Antikörper die Antikörper L19 und E8 verwendet
 werden.

6. Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch
 gekennzeichnet, daß der Farbstoff im sichtbaren Spektralbereich des Lichtes
 ein optisches Signal induziert.

7. Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch
 gekennzeichnet, daß der Farbstoff erst unter Verwendung eines definierten



Wellenlängenbereiches des sichtbaren oder nahinfraroten Lichtes ein Fluoreszenzsignal induziert.

8. Pharmazeutisches Mittel, umfassend ein oder mehrere Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 7, zur intraoperativen Darstellung der Randbereiche eines Krankheitsherdes.
9. Pharmazeutisches Mittel gemäß Anspruch 8, in Mischung mit geeigneten Lösungsmitteln, Puffern und/ oder Trägerstoffen.
10. Verwendung der Antikörper-Farbstoffkonjugate und Mittel gemäß den Ansprüchen 1 bis 9 zur intraoperativen Darstellung von Krankheitsherden.
11. Verwendung der Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 9 zur intraoperativen Darstellung der Randbereiche eines Krankheitsherdes.
12. Verwendung der Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 9 zur mikro- und makroskopischen, intraoperativen Darstellung der Randbereiche eines Krankheitsherdes.
13. Verwendung der Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 7 zur Herstellung eines Mittels zur chirurgischen Behandlung von angiogeneseabhängigen Erkrankungen, wie malignen Tumoren und deren Metastasen, benignen Tumoren, präkanzeröse Gewebsveränderungen, Endometriose, Hämangiomen und extrauterinen Schwangerschaften.



101088866

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 51739AWOM1XX	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/08121	International filing date (day/month/year) 19 August 2000 (19.08.00)	Priority date (day/month/year) 24 September 1999 (24.09.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 49/00,		
Applicant SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet.

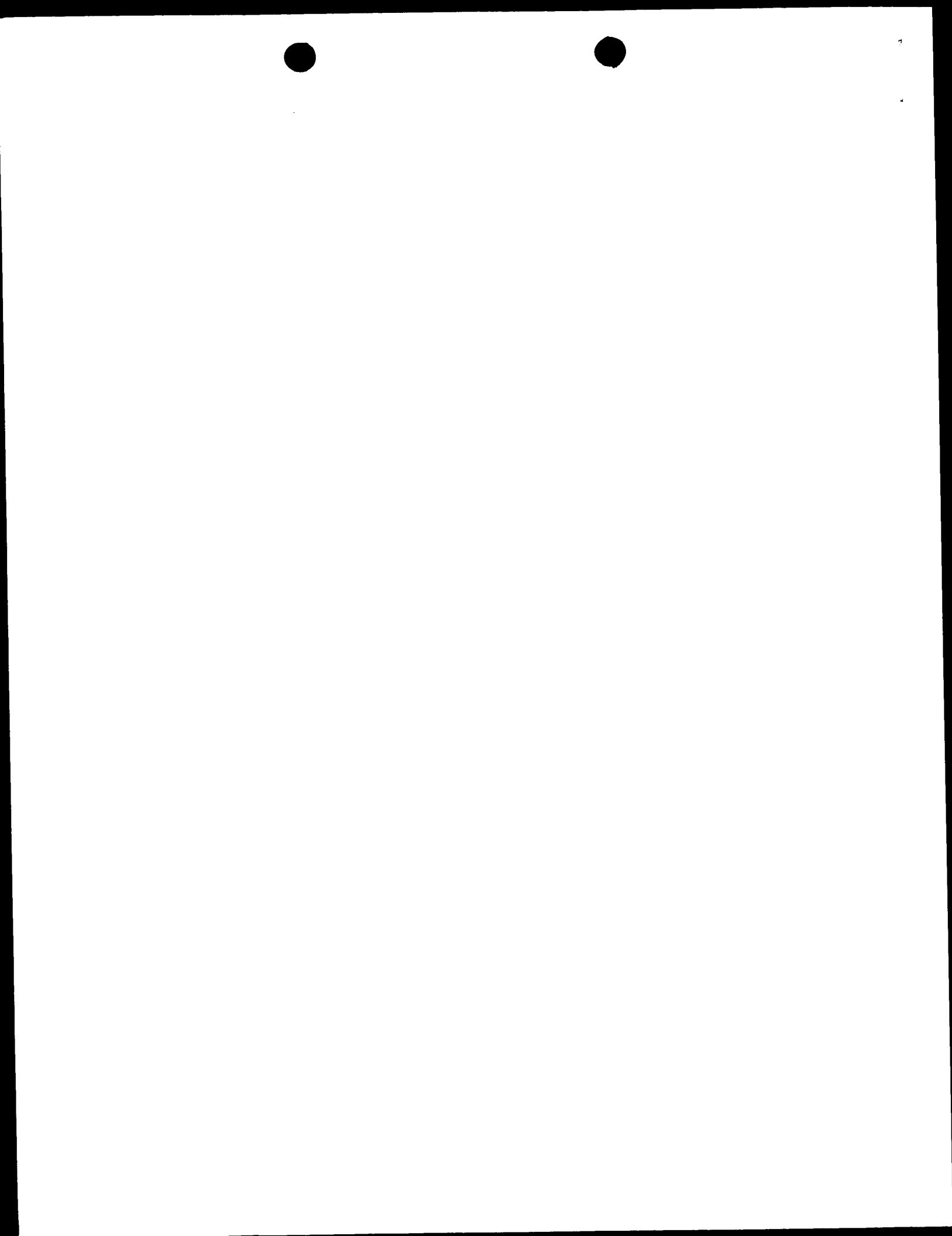
This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 4 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I Basis of the report
- II Priority
- III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV Lack of unity of invention
- V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI Certain documents cited
- VII Certain defects in the international application
- VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 16 February 2001 (16.02.01)	Date of completion of this report 15 January 2002 (15.01.2002)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/08121

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

 the international application as originally filed. the description, pages 1-14, as originally filed,

pages _____, filed with the demand,

pages _____, filed with the letter of _____,

pages _____, filed with the letter of _____.

 the claims, Nos. _____, as originally filed,

Nos. _____, as amended under Article 19,

Nos. _____, filed with the demand,

Nos. 1-13, filed with the letter of 21 November 2001 (21.11.2001),

Nos. _____, filed with the letter of _____.

 the drawings, sheets/fig _____, as originally filed,

sheets/fig _____, filed with the demand,

sheets/fig _____, filed with the letter of _____,

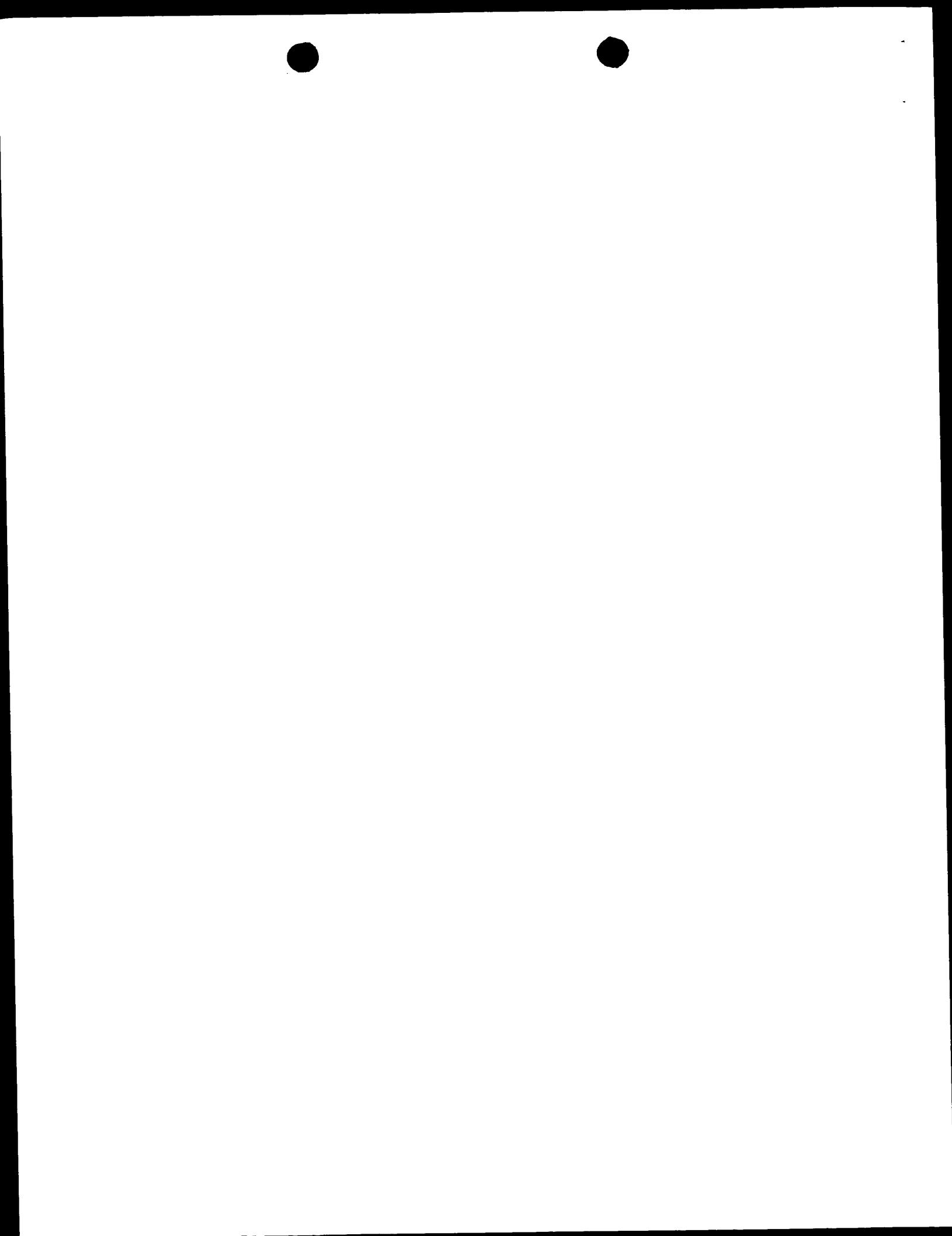
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

 the description, pages _____ the claims, Nos. _____ the drawings, sheets/fig _____

3. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/08121

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

the entire international application.

claims Nos. 4,13,10 - 12

because:

the said international application, or the said claims Nos. 10-12 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):

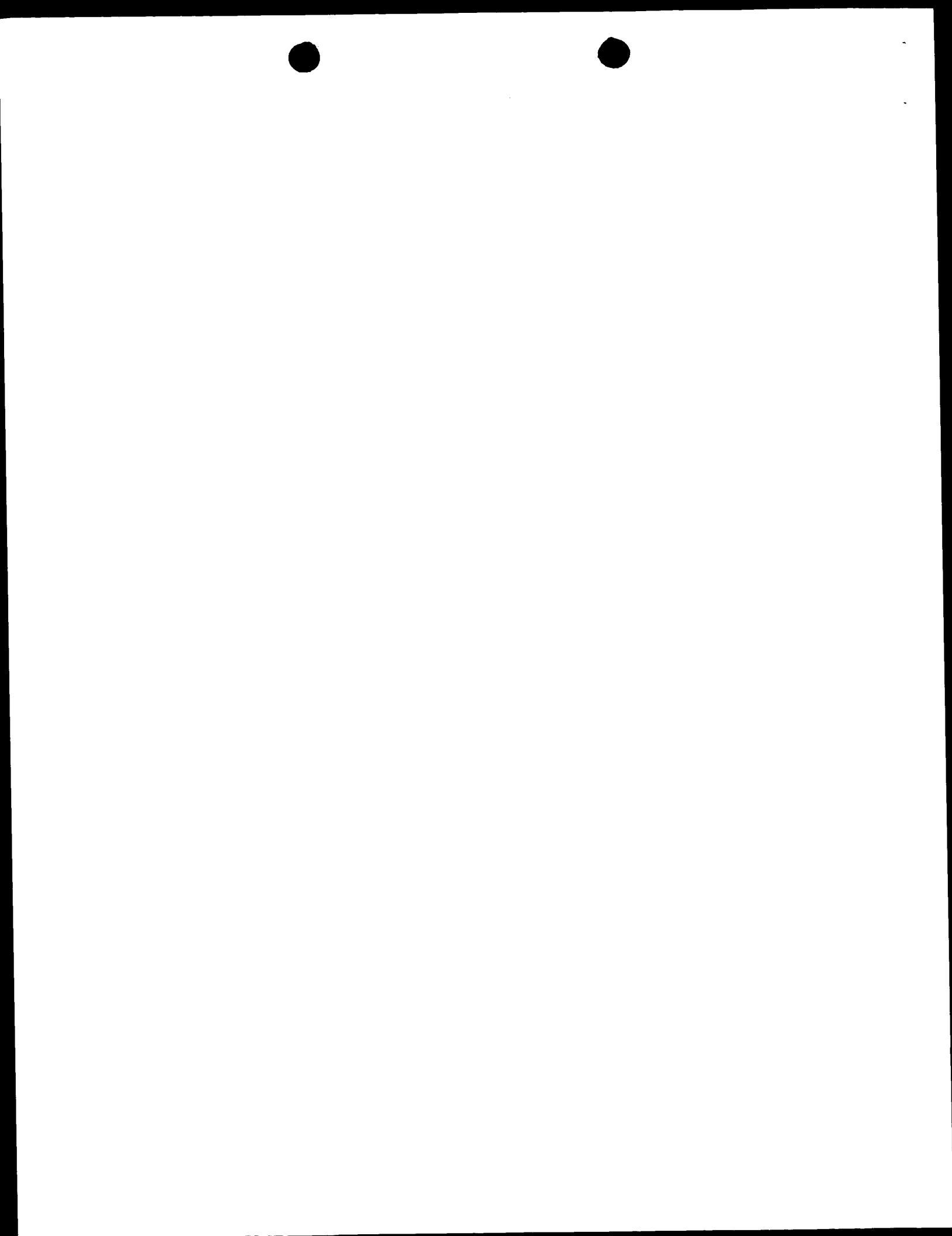
See Annex

the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. 4 are so unclear that no meaningful opinion could be formed (specify):

See Annex

the claims, or said claims Nos. 13 are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

no international search report has been established for said claims Nos. _____

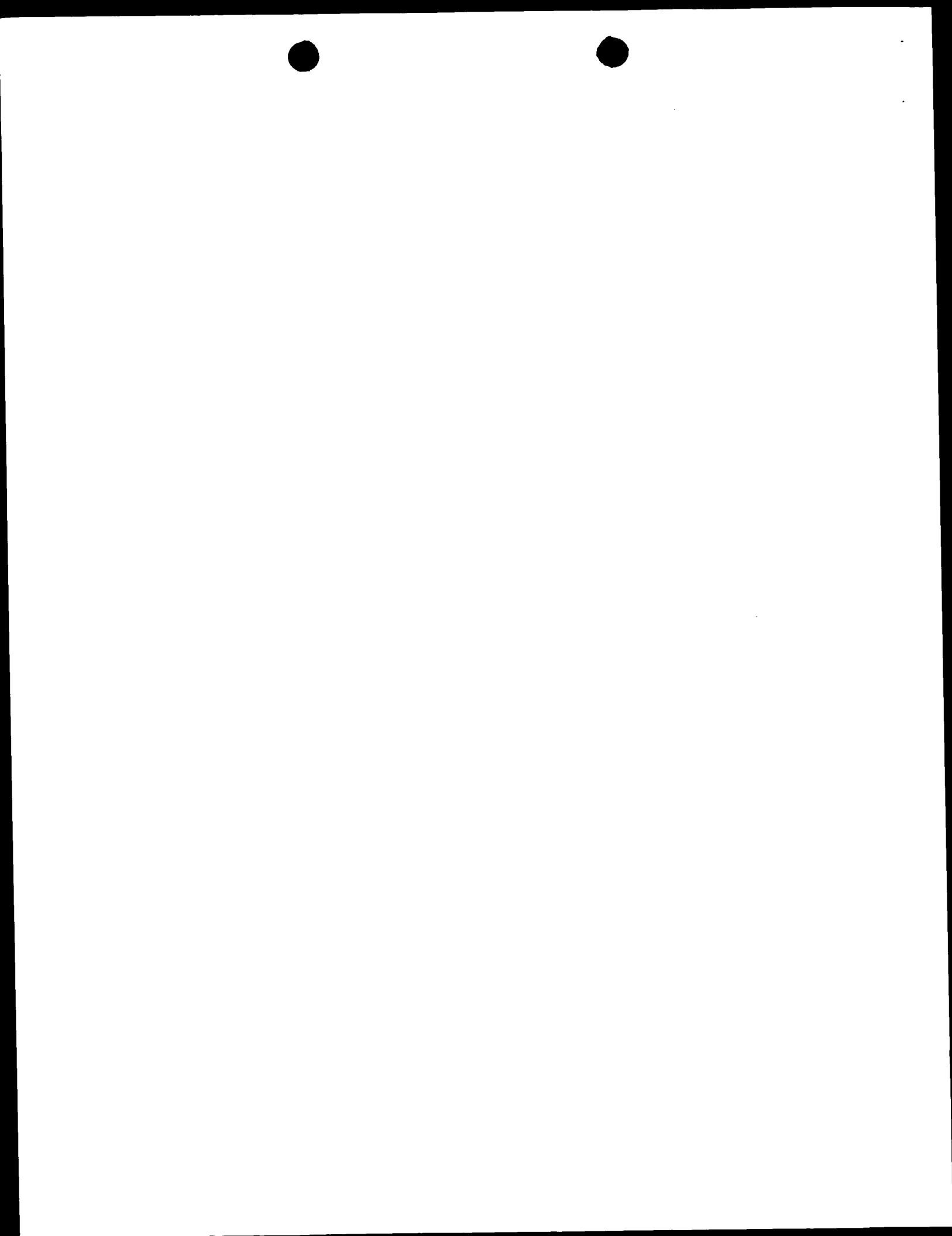


INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/EP 00/08121**I. Basis of the report**

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

The amendments submitted with the letter of 21.11.2001 introduce substantive matter which, contrary to PCT Article 34(2)(b), goes beyond the disclosure in the international application as filed. The amendments concerned are as follows:

The position holder Y in Claim 4 is not defined in the originally filed application. Even if the incomplete reproduction *per se* is an obvious typographical error, the definition given by the letter of 21.11.2001 is not so clear that it is possible to recognise immediately that nothing else might be intended (PCT Rule 91). Consequently, instead of Claim 4 filed with the letter of 21.11.2001, the originally filed Claim 5 is taken into account for the examination.



Supplemental Box

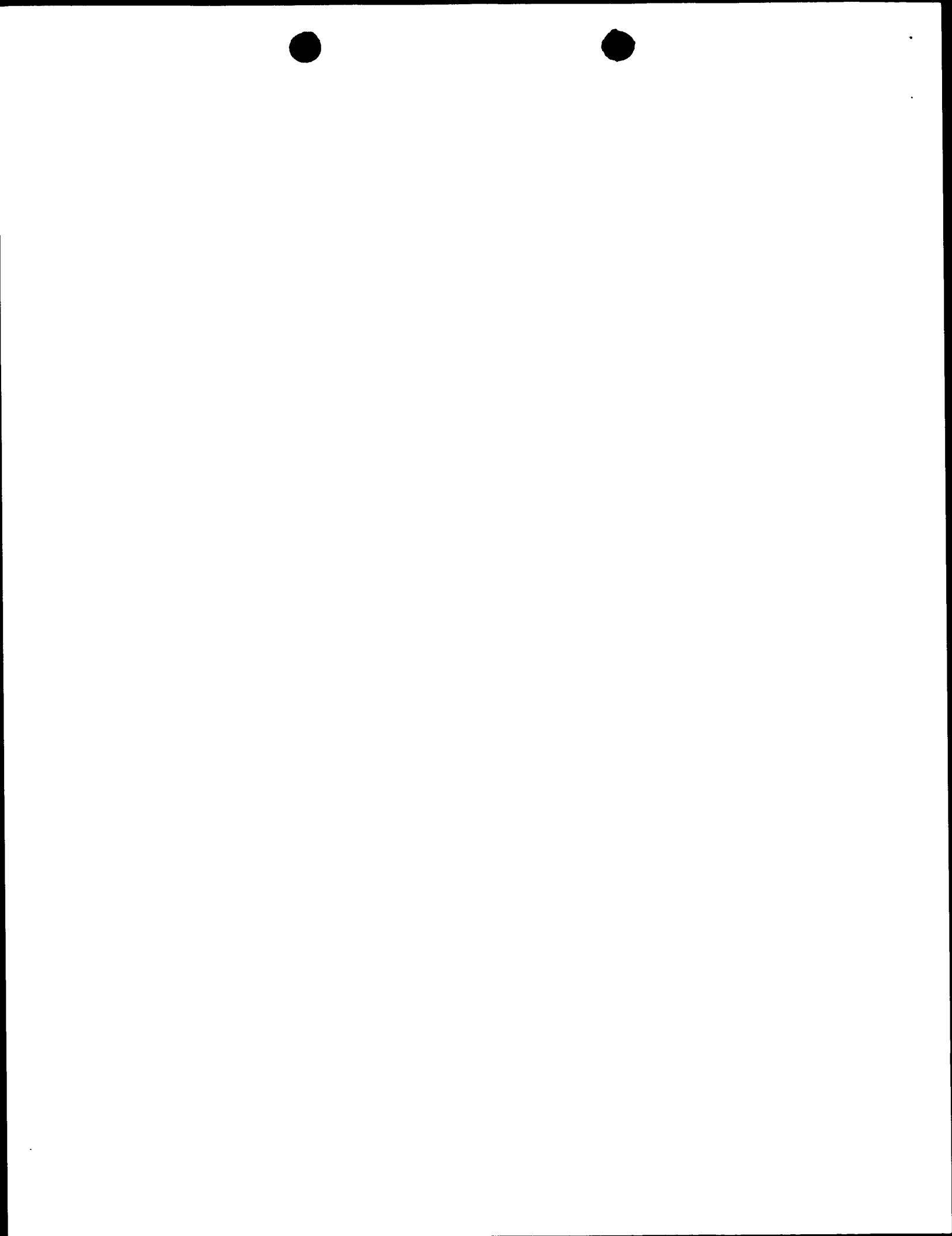
(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III

Claims 10 to 12 refer to subject matter that is covered by PCT Rule 67.1(iv), in the opinion of this Examining Authority. Consequently, no expert opinion is established about the industrial applicability of the subject matter of these claims (PCT Article 34(4)(a)(ii)).

The subject matter of Claim 5 (the original application, corresponds to Claim 4 with the letter of 21.11.2001) is not clear. The position holder Y of the general formula II is not defined. Consequently, Claims 5 to 13 (with the letter of 21.11.2001) that refer back to this claim are not clear either. Dependency on Claim 4 is not taken into consideration to examine Claims 5 to 13.

Moreover, Claim 13 is not supported by the description. According to the description, the claimed compounds can only be used to show angiogenesis-associated diseases but not for therapeutic treatment itself. A more detailed examination of Claim 13 cannot therefore be carried out.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 00/08121

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	5	YES
	Claims	1-3, 6-12	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-3, 5-12	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-9, 13	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

This report makes reference to the following documents:

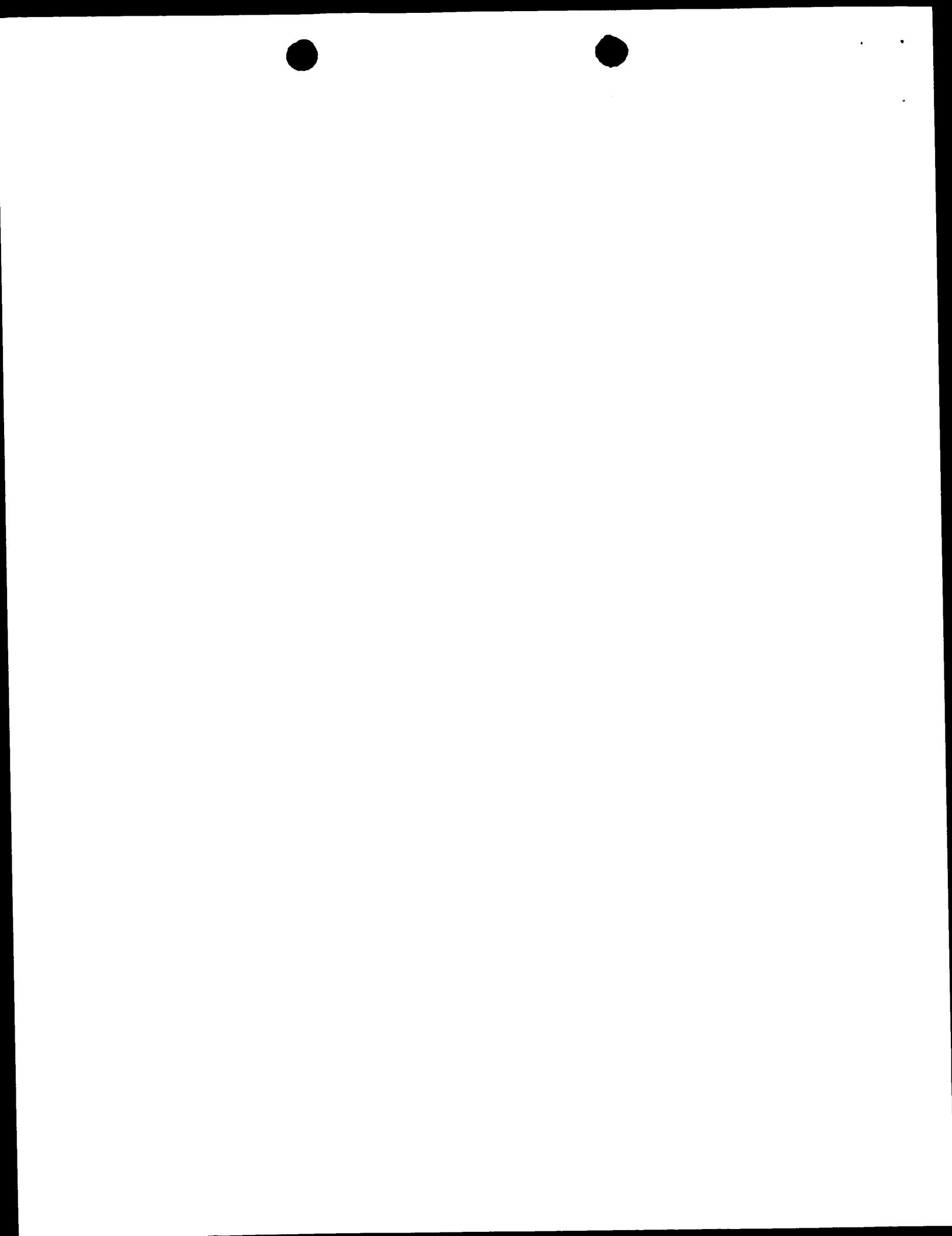
D1 NERI DARIO ET AL; "Targeting by affinity-matured recombinant antibody fragments of an angiogenesis associated fibronectin isoform." NATURE BIOTECHNOLOGY, Vol. 15, no. 12, 1997, pages 1271-1275, XP002124779 ISSN: 1087-0156 cited in the application

D2 VITI F ET AL: "Increased binding affinity and valence of recombinant antibody fragments lead to improved targeting of tumoral angiogenesis." CANCER RESEARCH, (1999 JAN 15) 59 (2) 347-52., XP002124782 cited in the application

D3 MARIANI G ET AL: "Tumor targeting potential of the monoclonal antibody BC-1 against oncofetal fibronectin in nude mice bearing human tumor implants." CANCER, (1997 DEC 15) 80 (12 SUPPL) 2378-84., XP000960444.

NoveltyClaims 1 to 3, 6 to 12

Present Claims 1 to 3 and 6 to 12 are not novel pursuant to PCT Article 33(2). D1 (page 1273, left-hand column, first section) and D3 (page 2379, left-hand column, penultimate section) describe antibody



fragments with a high level of bonding to EDB fibronectin that are marked with CY7, a cyanine dye that induces a fluorescent signal in visible or near infrared light. Tumours can be shown optically using these antibodies.

The feature of Claim 1, in which the dye conjugate builds up in the edge region of the focus of a disease, is not clear enough to be a distinguishing feature in relation to D1. Figures 1 to 3, page 1272 (D1) show that the antibodies described in D1 also build up in the edge region.

Consequently, the subject matter of Claims 1 to 3 and 6 to 12 is not novel (PCT Article 33(2)).

Claim 5

Claim 5 describes the conjugation of antibodies L19 or E8 with dyes.

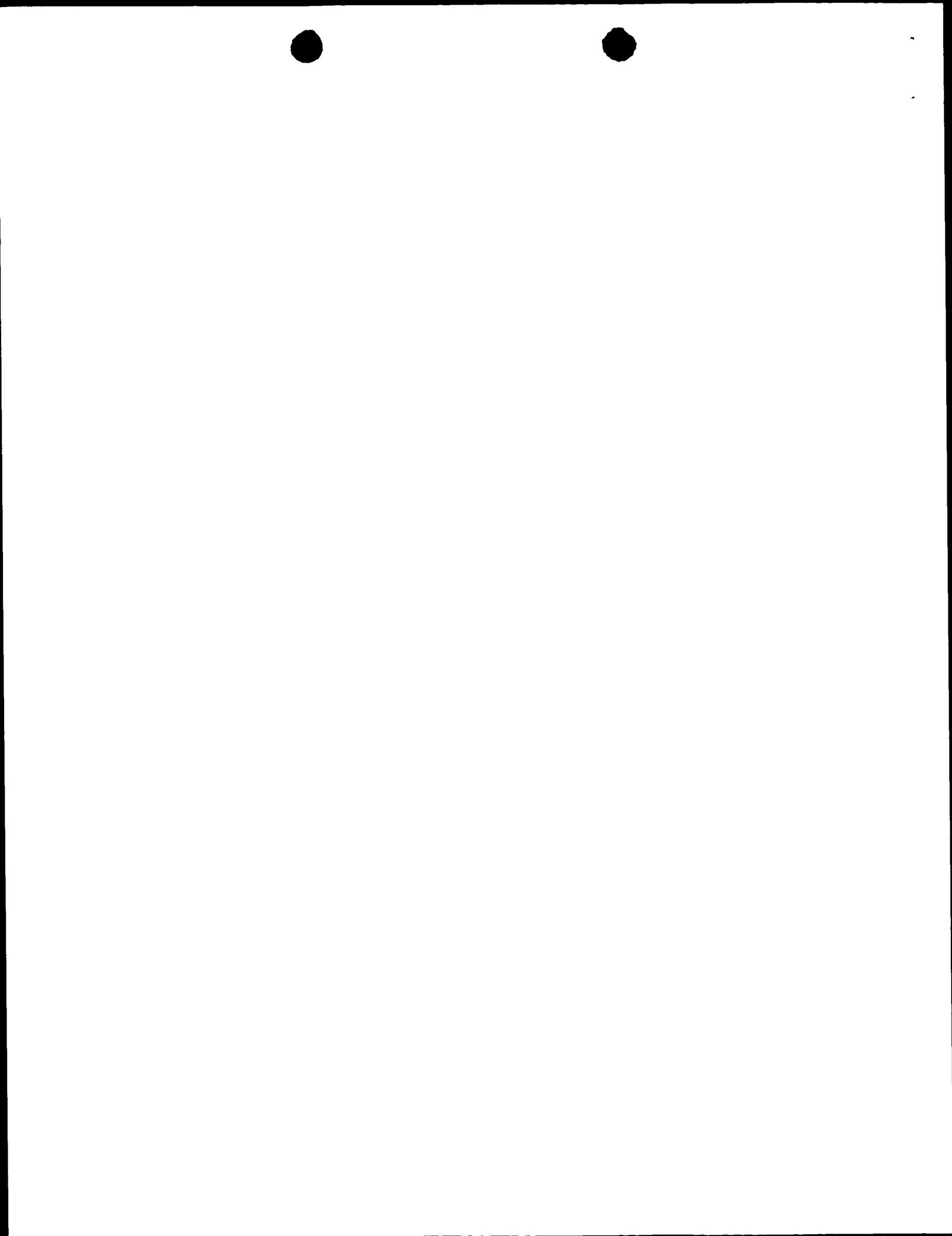
D2 describes the antibodies L19 with a radio marking. The use of dyes is not described directly. Consequently, the subject matter of Claim 5 is novel (PCT Article 33(2)).

Inventive step

Claim 5

D2 describes the use of radio-marked antibodies L19 for showing tumours (angiogenesis regions). More particularly, newly forming blood vessels are marked (page 349, Biodistribution studies, Figure 4). The blood vessels are newly formed in the edge region of the focus of a disease (also present application, page 1, lines 15 to 16). Consequently, it is implied that antibodies mark the newly-forming vessels and also the edge region of a tumour.

The present application differs by the use of dye



conjugates.

The problem to be solved by the invention can therefore be considered to be that of preparing alternative specific marked antibody conjugates to show the angiogenesis regions (edge region of a tumor).

The author of D2 proposes the conjugation of the antibody L19 with dyes to use it with IR fluorescent methods to recognise angiogenesis in patients (page 351, right-hand column). In this connection he refers to D1.

Since neither D1 nor D2 nor any other prior art describes obstacles to exchanging radio marking with a dye marking, it would be obvious to a person skilled in the art to combine the antibody L19 with a dye described in D1.

Consequently, the subject matter of Claim 5 does not meet the requirements of PCT Article 33(3).

Industrial applicability

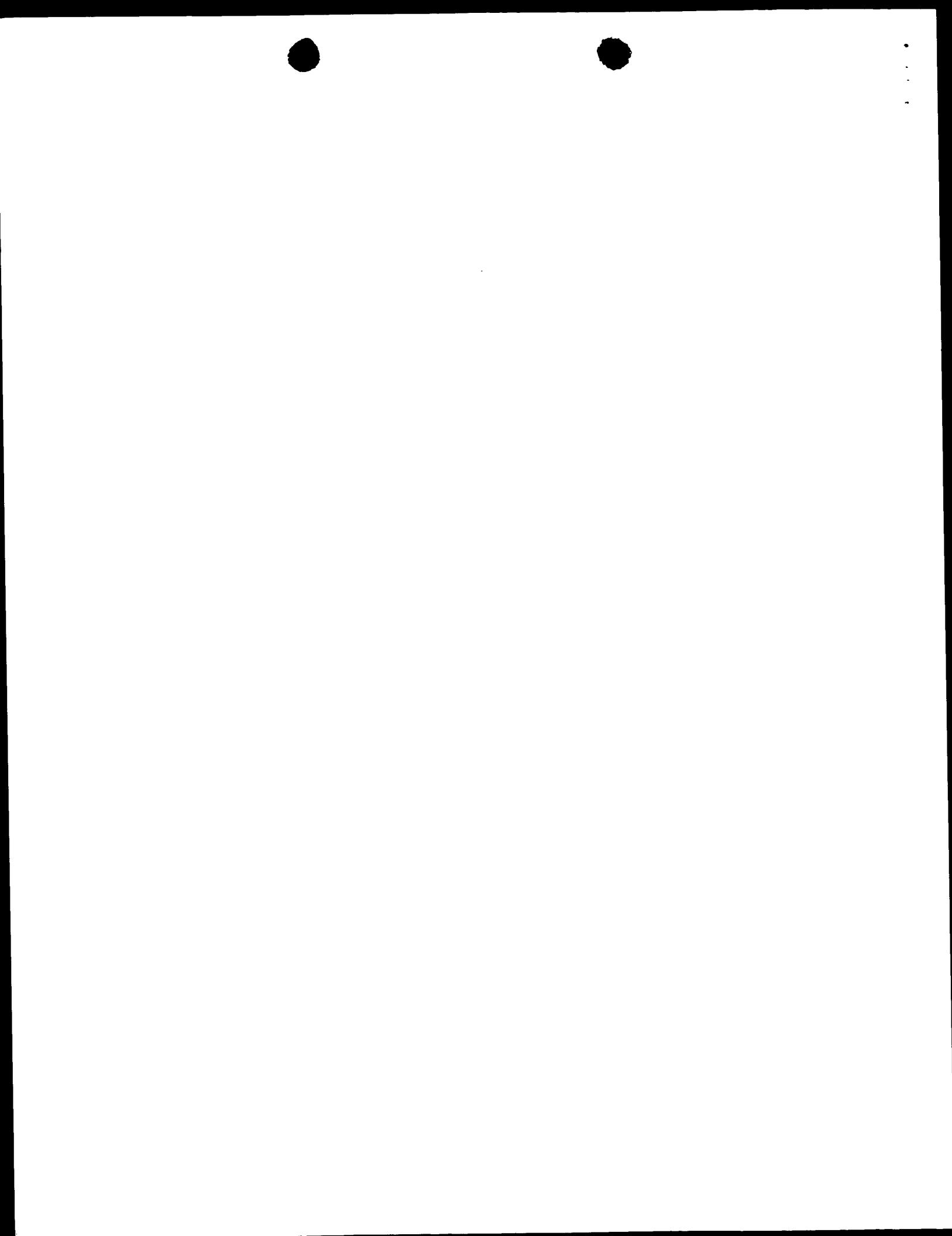
Claims 10 to 13

The PCT Contracting States do not have uniform criteria for assessing the industrial applicability of Claims 10 to 13 in their present form.

Patentability may depend on the wording of the claims. The EPO, for example, does not recognise the industrial applicability of claims to the medical use of a compound; it does, however, allow claims to the first medical use of a known compound or to the use of such a compound in the manufacture of a drug for a new medical application.

Claim 1 to 9

Claims 1 to 9 satisfy the requirements of PCT Article 33(4).



13 368868 1M
**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM
 GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 25 OCT 2001

WIPO PCT

Aktenzeichen des Annehmers oder Anwalts LTS 1999/020 PCT	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08919	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr) 13/09/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 22/09/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK G01N30/46		

RECEIVED

Annehmer

JAN 31 2003

LTS LOHMANN THERAPIE-SYSTEME AG et al.

TECH CENTER 1600/2900

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Annehmer gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 7 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 1 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I Grundlage des Berichts
- II Priorität
- III Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderlichen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 07/03/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 23.10.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Klee, B Tel. Nr. +49 89 2399 2675



INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08919

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-23 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

2-21 ursprüngliche Fassung

1 eingegangen am 04/10/2001 mit Schreiben vom 01/10/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/5-5/5 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung bzw. wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08919

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- Beschreibung, Seiten:
- Ansprüche, Nr.:
- Zeichnungen, Blatt:

5. Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- die gesamte internationale Anmeldung.
- Ansprüche Nr. 21.

Begründung:

- Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
- Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. 21 sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
siehe Beiblatt
- Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:

- Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.
- Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08919

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	15, 18-20
	Nein: Ansprüche	1-14, 16-17
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	15, 18-20
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-20
	Nein: Ansprüche	

**2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt**

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

1. Zitierte Referenzen

D1: WO 99 33862 A
D2: WO 92 02815 A
D3: WO 92 17259 A

Zu Punkt III

Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

Siehe Punkt 4. bezügliche Anspruch 21.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

2. Neuheit (Art.33(2) PCT)

2.1 Zu Anspruch 1

D1 offenbart ein Verfahren zur Identifizierung (Seite 6, Zeilen 5-12; Seite 10, Seite 11, Zeile 40) mindestens einer aktiven chemischen Substanz aus einem Gemisch aktiver und inaktiver chemischer Substanzen, gekennzeichnet durch die Schritte:

- a) Hinzufügen eines Targets zu diesem Gemisch und Bildung eines Komplexes aus Target und mindestens einer aktiven chemischen Substanz des Gemisches (Seite 2, Zeilen 27-32),
- b) Abtrennung des Komplexes von den inaktiven chemischen Substanzen des Gemisches (Seite 2, Zeilen 27-32), und
- c) Freisetzung, Isolierung und Identifizierung mindestens einer aktiven chemischen Substanz aus dem abgetrennten Komplex (Seite 3, Zeilen 9-13; Seite 10, Zeile 33 - Seite 11, Zeile 5). Daher ist der Gegenstand des Anspruch 1 nicht neu im Hinblick auf D1.

Die abhängigen Ansprüche 1-14 und 16-17 enthalten keine Merkmale, die in Kombination mit den Merkmalen irgendeines Anspruchs, auf den sie sich beziehen, die Erfordernisse des PCT in bezug Neuheit erfüllen. Die Gründe dafür sind die folgenden:

2.2 Zu den abhängigen Ansprüchen 2-4

Bei dem Verfahrensschritt: Hinzufügen des Targets zu dem Gemischs von chemischen Substanzen in einer **Lösung, Suspension oder Dispersion** handelt es sich um einen für den Fachmann üblichen Verfahrensschritt. Ebenso arbeitet der Fachmann der zum Beispiel mit biochemischen Substanzen arbeitet meistens in gepufferten Systemen (siehe auch D1 Example 1 Tris-puffer pH7.1).

2.3 Zu den abhängigen Ansprüchen 5-7

D1 beschreibt ein Verfahren, in dem der Komplex durch eine Bindung zwischen der aktiven Substanz und dem Target hergestellt wird. Diese Bindung ist nicht-kovalent ("hydrophobic or ionic interaction" Seite 2, Zeile 39).

2.4 Zu den abhängigen Ansprüchen 8-11

D1 beschreibt ein Verfahren, in dem die Abtrennung des Komplexes, Isolierung oder Identifizierung, mittels Ultrafiltration, Ultrazentrifugation oder anderer geeigneter Methoden (HPLC) erfolgt (Seite 10, Zeilen 33-39; Examples).

2.5 Zu den Ansprüchen 12-14

D1 beschreibt ein Verfahren, in dem das Gemisch aktiver und inaktiver Substanzen ein Naturstoffextrakt ist (Seite, 11, Zeilen 7-14).

2.6 Zu den Ansprüchen 16,17

D1 beschreibt ein Verfahren, in dem als Target Antikörper verwendet werden (Seite 11, Zeile 12).

3. Erfinderische Tätigkeit Art.33(3) PCT)

3.1 Zu Anspruch 1 (zweite Alternative Verfahrensschritt d))

Dokument D1, das als nächstliegender Stand der Technik angesehen wird, offenbart ein Verfahren zur Identifizierung (Seite 6, Zeilen 5-12; Seite 10, Seite 11, Zeile 40) mindestens einer aktiven chemischen Substanz aus einem Gemisch aktiver und inaktiver chemischer Substanzen, gekennzeichnet durch die Schritte:
a) Hinzufügen eines Targets zu diesem Gemisch und Bildung eines Komplexes aus Target und mindestens einer aktiven chemischen Substanz des Gemisches (Seite 2, Zeilen 27-32),
b) Abtrennung des Komplexes von den inaktiven chemischen Substanzen des Gemisches (Seite 2, Zeilen 27-32), von dem sich der Gegenstand des Anspruchs

1 dadurch unterscheidet, daß

d) die Identifizierung mindestens einer aktiven Substanz durch Differenzbildung eines Chromatogramms des Gemisches aktiver und inaktiver chemischer Substanzen und eines Chromatogramms des nach Abtrennung des Komplexes erhaltenen Gemisches inaktiver Substanzen.

Die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe kann somit darin gesehen werden, ein schnelles Verfahren zur Verfügung zu stellen, mit dem eine Substanz aus einem Gemisch von Substanzen zu identifiziert werden kann. D2 stellt hierfür dem Fachmann das Verfahren der subtraktiven Chromatographie zu Verfügung (D2 Seite 6, Absatz 1 und Seite 16,17, Figuren 5, 6). Für den selben Zweck stellt auch D3 das gleiche Verfahren zur Verfügung (Seite 5, 2. Absatz).

Daher ist die zweite Alternative (d)) in Anspruch 1 durch D1 in Verbindung mit D2 oder in Verbindung mit D3 nahegelegt.

3.1 Zu den abhängigen Ansprüchen

Die abhängigen Ansprüche 15, 18, 19, 20 enthalten keine Merkmale, die in Kombination mit den Merkmalen irgendeines Anspruchs, auf den sie sich beziehen, die Erfordernisse des PCT in bezug erforderliche Tätigkeit erfüllen. Die Gründe dafür sind die folgenden:

- Zu Anspruch 15:

Das Verfahren auf ein Gemisch, das mindestens 50 verschiedene Substanzen enthält anzuwenden liegt in dem üblichen Handeln eines Fachmanns.

- Zu den Ansprüchen 18-20

Ebenfalls liegt es im Bereich des fachüblichen Handels bei dem Bedürfnis Thrombin, Trypsin oder den β_2 -Adrenorezeptoren zu analysieren, diese in dem beanspruchten Verfahren einzusetzen.

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

4. Klarheit (Art.6 PCT)

Der Anspruch 21 entspricht nicht den Erfordernissen des Artikels 6 PCT, weil der Gegenstand des Schutzbegehrens nicht klar definiert ist. In dem Anspruch sind keinerlei Merkmale enthalten, die die Vorrichtung definieren.

Patentanprüche

1. Verfahren zur Identifizierung mindestens einer aktiven chemischen Substanz aus einem Gemisch aktiver und inaktiver chemischer Substanzen, gekennzeichnet durch die Schritte:
 - a) Hinzufügen eines Targets zu diesem Gemisch und Bildung eines Komplexes aus Target und mindestens einer aktiven chemischen Substanz des Gemisches,
 - b) Abtrennung des Komplexes von den inaktiven chemischen Substanzen des Gemisches, und entweder
 - c) Freisetzung, Isolierung und Identifizierung mindestens einer aktiven chemischen Substanz aus dem abgetrennten Komplex oder
 - d) Identifizierung mindestens einer aktiven chemischen Substanz des Gemisches durch Differenzbildung eines Chromatogramms des Gemisches aktiver und inaktiver chemischer Substanzen und eines Chromatogramms des nach Abtrennung des Komplexes erhaltenen Gemisches inaktiver chemischer Substanzen.